



# Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

REC'D 29 JUL 2004

WIPO

PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: INV. IND.

N. RM2003A000242 DEL 19.05.2003



*Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

na, 28 GIU. 2004

IL FUNZIONARIO

Giampietro Carlotta

BEST AVAILABLE COPY

A. RICHIEDENTE(I)  
 1) Denominazione ENEA - Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente N.G. E N  
 Residenza Roma, RM codice 0 1 3 2 0 7 4 0 5 8 0  
 2) Denominazione CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE N.G. E N  
 Residenza Roma, RM codice 0 0 9 6 2 4 2 1 0 0 4

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.  
 Cognome e nome GITTO Serena ed altri Cod. fiscale \_\_\_\_\_  
 Denominazione studio di appartenenza Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.  
 Via Piemonte n. 26 città ROMA Cap 0 0 1 8 7 (prov) R M

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.  
 Via Piemonte n. 26 città ROMA Cap 0 0 1 8 7 (prov) R M

D. TITOLO classe proposta (sez./cl/sci) \_\_\_\_\_ gruppo/sottogruppo \_\_\_\_\_  
"Metodo per la preparazione di piante transgeniche resistenti in maniera duratura ai geminivirus".

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒ SE ISTANZA: DATA \_\_\_\_\_ N° PROTOCOLLO \_\_\_\_\_

E. INVENTORI DESIGNATI cognome e nome  
 1) TAVAZZA Mario 3) LUCIOLI Alessandra  
 2) NORIS Emanuela 4) ACCOTTO Gian Paolo

F. PRIORITÀ  
 nazione o organizzazione tipo di priorità numero di domanda data di deposito Allegato S/R  
 1) \_\_\_\_\_  
 2) \_\_\_\_\_

## SCIOGLIMENTO RISERVE

Data N. Protocollo

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione \_\_\_\_\_

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

001 - I titolari partecipano ai diritti sul brevetto nelle seguenti misure:

ENEA - Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente: 50%

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE: 50%

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.  
 Doc. 1) 1 n. pag. 5 2 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)  
 Doc. 2) 1 PROV n. tav. 1 0 Disegno  
 Doc. 3) 2 Lettera d' Incarico  
 Doc. 4) 1 designazione inventore  
 Doc. 5) \_\_\_\_\_ documenti di priorità con traduzione in italiano  
 Doc. 6) \_\_\_\_\_ autorizzazione o atto di cessione  
 Doc. 7) \_\_\_\_\_ nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale Euro QUATTROCENTOSETTANTADUE /56 obbligatorio

COMPILATO IL 1 9 / 0 5 / 2 0 0 3

CONTINUA SI/NO S I

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO S I

FIRMA DEL(I) Enea - Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente  
 RICHIEDENTE(I) CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

Serena Gitto

(N° d'iscr. 962 B)

CAMERA di COMMERCIO, IND. ART. e AGR. - RM 2003 A 000242 ROMA codice 5 8

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA \_\_\_\_\_ Reg. A

L'anno DUEMILATRE, il giorno DICIANNOVE, del mese di MAGGIO

Il(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 0 1 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraripartato.

ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE \_\_\_\_\_

IL DEPOSITANTE



L'UFFICIALE ROGANTE  
L'Ufficiale Rogante  
Silvia Allari

FOGLIO AGGIUNTIVO n. 01

di totali 01

DOMANDA N.

REG. A

RM 2003 A 000242

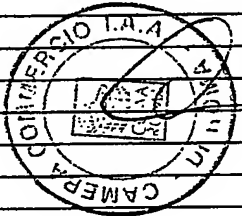
N.G.

## A. RICHIEDENTE (1)

<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		codice
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		codice
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		codice
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		codice
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		codice
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		codice

## E. INVENTORI DESIGNATI

cognome e nome		cognome e nome	
05	TAVAZZA Raffaella		
06	BRUNETTI Angela		



## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R	SCIOGLIMENTO RISERVE Data N° Protocollo

FIRMA DEL(1) RICHIEDENTE(1)

1) ENEA - Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente

2) CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE **IN MANDATARIO**

Ing. Barzanò &amp; Zanardo Roma S.p.A.

per se e per gli altri

Serena Gitto

(N° d'iscr. 962 B)

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

## RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

PROSPETTO A

NUMERO DOMANDA

REG. A

DATA DI DEPOSITO 1 | 9 | / | 0 | 5 | / | 2 | 0 | 0 | 3 |

NUMERO BREVETTO

RM 2003 A 000242

DATA DI RILASCIO

A. RICHIEDENTE(I)

1) Denominazione

ENEA – Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente

2) Denominazione

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

D. TITOLO

"Metodo per la preparazione di piante transgeniche resistenti in maniera duratura ai geminivirus".

Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

L'invenzione concerne un metodo per l'ottenimento di piante transgeniche resistenti in maniera duratura ai geminivirus, nelle quali il transgene consiste in una sequenza polinucleotidica opportunamente modificata, derivata dal patogeno

M. DISEGNO



RM 2003 A 000242

## DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo: " Metodo per la preparazione di piante transgeniche resistenti in maniera duratura ai geminivirus "

Titolari: ENEA - Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente;

### CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

Inventori: Mario TAVAZZA, Emanuela NORIS, Alessandra LUCIOLI,  
Gian Paolo ACCOTTO, Raffaella TAVAZZA, Angela BRUNETTI

\*\*\*\*

\* \* \*

La presente invenzione concerne un metodo per la preparazione di piante transgeniche resistenti in maniera duratura ai geminivirus.

Più in particolare l'invenzione si riferisce ad un metodo per la preparazione di piante transgeniche resistenti in maniera duratura ai geminivirus, nelle quali il transgene consiste in una sequenza polinucleotidica, derivata dal patogeno, opportunamente modificata in modo da risultare bersaglio inefficiente del silenziamento genico post-trascrizionale indotto dai geminivirus.

E' noto che i geminivirus sono un'ampia e diversificata classe di virus vegetali che infetta diverse piante d'interesse agronomico causando gravi perdite di raccolto. Tali virus sono caratterizzati da virioni composti da due particelle icosaedriche geminate. Il genoma, costituito da una o due molecole di DNA circolare a singolo filamento

*Ing. Barzani & Lanardo Roma S.p.A.*

(ssDNA), si replica nei nuclei delle cellule infette tramite intermedi a doppia elica (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999).

La famiglia *Geminiviridae* è suddivisa in quattro generi denominati *Mastrevirus*, *Begomovirus*, *Curtovirus* e *Topocuvirus* sulla base dell'insetto vettore che li diffonde, dello spettro d'ospite e della struttura del genoma ( Briddon *et al.*, 1985; Fauquet *et al.*, 2003).

Una grave malattia del pomodoro, trasmessa dall'aleurodide *Bemisia tabaci*, è nota da tempo nelle aree del Medio Oriente, Sud Est Asiatico ed in Africa, con il nome di accartocciamento fogliare giallo ("tomato yellow leaf curl") (Czosnek *et al.*, 1997). La malattia che può causare perdite del raccolto del 100% (Picò *et al.*, 1996; Czosnek *et al.*, 1997), si è successivamente diffusa sia nel Mediterraneo Occidentale, raggiungendo la Sardegna, la Sicilia e la Spagna (Czosnek *et al.*, 1997), sia in America (Polston *et al.*, 1997).

Recentemente sono stati identificati ed isolati gli agenti della malattia, virus appartenenti alla famiglia *Geminiviridae*, genere *Begomovirus*. Studi filogenetici hanno evidenziato la presenza di differenti specie virali correlate alle diverse origini geografiche dei *Begomovirus*: Asia, Africa e America (Czosnek *et al.*, 1997).

Il genoma della specie Tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV) è monopartito (Kheyr-Pour *et al.*, 1991). Il DNA è trascritto bidirezionalmente e contiene sei moduli aperti di lettura (ORF), di cui due sul filamento virale (V): V1 e V2 e quattro sul filamento complementare (C): C1, C2, C3 e C4, come mostrato nella figura 1. Tra le ORF C1 e V1 vi è una regione non codificante denominata regione

intergenica (IR) analoga a quella presente nei genomi di tutti i *Geminiviridae*. L'organizzazione genomica del TYLCSV è simile da un punto di vista strutturale a quella del componente A dei *Begomovirus* bipartiti come il virus del mosaico dorato del pomodoro (TGMV) e il virus della manioca africana (ACMV). Nel caso dei *Begomovirus* bipartiti la nomenclatura delle ORFs presenti sul filamento complementare del componente A è: AL1 o AC1, AL2 o AC2, AL3 o AC3, AL4 o AC4 mentre sul filamento virale AR1 o AV1, AR2 o AV2; sul filamento complementare del componente B è: BL1 o BC1 e sul filamento BR1 o BV1.

Le strategie fino ad oggi impiegate per controllare l'infezione dei geminivirus trasmessi dalla *Bemisia tabaci* si basano sull'uso di costose reti a maglia fine (per la coltivazione del pomodoro da tavola) e soprattutto su ripetuti trattamenti insetticidi (coltivazioni di pomodoro sia da tavola che da industria). Tali strategie comportano un aumento dei costi di produzione e rappresentano un pericolo concreto per la salute degli operatori agricoli e del consumatore. Inoltre è già stata segnalata l'insorgenza di popolazioni di *Bemisia tabaci* resistenti all'insetticida imidacloprid (Cahill *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1996).

Il modo più pratico ed economico per controllare le infezioni virali è quello di sviluppare specie coltivate resistenti. I programmi di miglioramento genetico classico per l'introduzione di caratteri di resistenza ai geminivirus che provocano l'accartocciamento fogliare giallo del pomodoro si sono basati sul trasferimento dei geni responsabili della resistenza dalle specie selvatiche del *Lycopersicon*

alle specie di pomodoro coltivate. Sono state così ottenute e commercializzate specie coltivate tolleranti, cioè che permettono al virus di replicarsi ma mostrano sintomi ridotti, limitando quindi il danno economico alle colture.

Tuttavia, la presenza di virus nelle piante tolleranti rappresenta un pericolo perché serbatoio per ulteriori infezioni.

Un altro aspetto importante da considerare è che le caratteristiche agronomiche delle linee ottenute non sono sempre ottimali e comunque rispecchiano quelle del genotipo di pomodoro coltivato utilizzato nei programmi di incrocio.

Tuttora non è stata ancora rilasciata una linea di pomodoro resistente ai virus che provocano la malattia dell'accartocciamento fogliare giallo del pomodoro, cioè con assenza di sintomi e di DNA virale.

Con l'avvento dell'ingegneria genetica si sono aperte nuove prospettive per l'introduzione di caratteri di resistenza ai virus vegetali. La maggior parte delle strategie si basa sull'introduzione e sull'espressione nella pianta d'interesse di sequenze derivate dal patogeno, Pathogen Derived Resistance (PDR) (Sanford & Johnson, 1985; Abel *et al.*, 1986; Tavazza e Lucioli, 1993).

Sebbene tali strategie siano state applicate con successo per introdurre caratteri di resistenza a virus vegetali con genoma ad RNA (Beachy, 1997), nel caso dei geminivirus, il cui genoma è a DNA, l'espressione di sequenze derivate dal patogeno ha prodotto piante con resistenze e/o tolleranze non durevoli.

ING. BARZANO & ZANARDI ROMA SPA





I meccanismi d'azione che inducono resistenza a virus ottenuta tramite l'espressione di sequenze derivate dal patogeno possono essere raggruppati in due ampie classi:

a) resistenza mediata dall'espressione di una proteina del patogeno come ad esempio l'espressione di dominanti negativi;

b) resistenza mediata dal silenziamento genico post-trascrizionale (Baulcombe, 1996; Beachy, 1997; Zaitlin and Palukaitis, 2000).

Il silenziamento genico post-trascrizionale è un processo ubiquitario negli eucarioti, che prevede la degradazione di specifici RNA a seguito della formazione di molecole di RNA a doppia elica (dsRNA) aventi sequenza omologa all'RNA bersaglio.

Sebbene vi possano essere differenti contesti in grado di indurre la produzione di dsRNA omologhi al transgene (trascrizione di RNA transgenici aberranti, presenza nell'RNA del transgene di sequenze invertite e ripetute sufficientemente estese, integrazione del transgene nel genoma della pianta in copie multiple invertite e ripetute), in tutti i casi, una volta prodotto il dsRNA, quest'ultimo viene riconosciuto e degradato ad opera di alcuni meccanismi cellulari in corte molecole di dsRNA di circa 21-26 nucleotidi, denominate siRNA.

I siRNA così prodotti vengono integrati in un complesso multiproteico denominato RISC che è in grado di degradare tutti gli RNA aventi omologia di sequenza con i siRNA. Questi ultimi rappresentano quindi i determinanti di specificità del silenziamento dell'RNA e la loro presenza in relazione ad una determinata sequenza

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO  
FACOLTÀ DI SCIENZE  
CORSO DI LAUREA IN SCIENZE  
DELLA VITA E DELLA SANITÀ  
SEZIONE DI SCIENZE  
DELLA VITA E DELLA SANITÀ  
CORSO DI LAUREA IN SCIENZE  
DELLA VITA E DELLA SANITÀ

definisce in maniera univoca che detta sequenza di RNA è silenziata post-trascrizionalmente.

Quindi, piante transgeniche esprimenti sequenze derivate dal genoma di virus ad RNA, silenziate post-trascrizionalmente, sono resistenti al virus omologo e a virus con sequenze strettamente correlate a livello nucleotidico con le sequenze del transgene.

Il silenziamento del transgene può essere indotto anche in seguito all'infezione di virus.

Infatti, la replicazione virale è in grado di indurre il silenziamento di un transgene, inizialmente non silente, se la sequenza nucleotidica del transgene è omologa ad una porzione del genoma del virus infettante. L'attivazione del meccanismo di silenziamento comporta la degradazione specifica delle molecole di RNA aventi omologia di sequenza con l'RNA induttore.

Come diretta conseguenza, l'attivazione del silenziamento da parte del virus è accompagnata dalla degradazione sia delle sequenze dell'mRNA transgenico omologhe al virus sia del genoma virale. Ciò si traduce di fatto nel risanamento dell'ospite dopo un'iniziale fase infettiva, in modo tale che la nuova parte vegetativa risulta esente da virus. Una caratteristica peculiare dei tessuti della pianta che si sviluppano successivamente al fenomeno del risanamento è che sono altamente resistenti ad una successiva infezione dello stesso virus.

Le resistenze mediate dal silenziamento genico post-trascrizionale, basandosi su un riconoscimento a livello nucleotidico, conferiscono resistenza solo rispetto agli isolati virali strettamente

omologhi al genoma del virus da cui deriva il transgene. Invece, le strategie basate sull'espressione di una proteina del patogeno normalmente producono piante resistenti a ceppi o isolati virali anche non strettamente correlati dal punto di vista nucleotidico.

E' stato altresì dimostrato che il silenziamento del transgene è influenzato dalla temperatura, non essendo attivo a temperature inferiori a 15°C (Szittyá *et al.*, 2003) quindi piante esposte in condizioni di campo con escursioni a temperature inferiori a 15°C possono perdere la resistenza mediata dal silenziamento.

E' altresì da tenere in considerazione che sebbene da diversi anni siano state ottenute piante transgeniche resistenti a virus con genoma ad RNA mediante meccanismi basati sul silenziamento del transgene, ad oggi non è riportato che tale strategia possa essere applicata con successo ai geminivirus (virus con genoma a DNA).

E' evidente che la migliore strategia per l'ottenimento di piante resistenti ad un ampio spettro di geminivirus è quella in cui il prodotto interferente è la proteina. E' altresì evidente che l'ampiezza dello spettro di resistenza aumenta il valore agronomico e commerciale della pianta prodotta

In tal senso è stata utilizzata l'espressione in piante transgeniche di varianti disfunzionali della proteina replicativa Rep dei geminivirus per ottenere piante con maggiori livelli di tolleranza/resistenza ai geminivirus.

E' noto in letteratura che l'espressione di una forma tronca della proteina replicativa Rep (Rep-210) del TYLCSV è in grado di

conferire resistenza all'infezione virale, sebbene tale resistenza non sia di tipo durevole in quanto il virus riesce a superarla nel tempo.

Nelle tabelle 1 e 2 sono riportati i risultati delle analisi della resistenza di piante transgeniche rispettivamente di *Pomodoro 47 x wt* (Brunetti *et al.* 1997) e di *N. benthamiana* linea 102.22 (Noris *et al.* 1996) esprimenti la Rep-210 inoculate con il TYLCSV mediante agroinoculazione.

Tabella 1

Piante	Tempo (settimane)	N° piante infette/ piante inoculate	% piante infette/ piante inoculate
Rep-210	4	0/13	0
	9	2/13	15
	18	5/13	38
Wild type	4	6/6	100

Tabella 2

Piante	Tempo (settimane)	N° piante infette/ piante inoculate	% piante infette/ piante inoculate
Rep-210	2	4/21	19
	3	11/21	52
	4	18/21	86
Wild type	2	6/6	100

Come si evince chiaramente dai risultati riportati in tabella 1 e 2, la resistenza al TYLCSV mediata dall'espressione transgenica di una sequenza derivata dal patogeno viene superata nel tempo.

ING. CALZANO & ZANARDI ROMA SPA



In maniera analoga anche la resistenza transgenica indotta dalla espressione di un mutante dominante negativo della Rep del geminivirus bipartito "African Cassava Mosaic Virus" è superata nel tempo (Sangaré *et al.*, 1999).

Un altro esempio è rappresentato dall'espressione transgenica della proteina del capsido del TYLCV in un ibrido interspecifico di pomodoro (*Lycopersicon esculentum* X *L. pennellii*) che conferisce una parziale resistenza all'infezione virale (Kunik *et al.*, 1994). Anche in questo caso la resistenza mediata dall'espressione della proteina del capsido non è durevole e risulta di scarsa utilità dal punto di vista agronomico.

Alla luce di quanto sopra esposto, risulta evidente l'esigenza di potere disporre di nuove metodologie che permettano di utilizzare con successo le sequenze polinucleotidiche derivate dai geminivirus al fine di ottenere piante resistenti in maniera duratura ai geminivirus.

Gli autori della presente invenzione hanno ora preparato sequenze polinucleotidiche, codificanti per proteine virali derivate dal patogeno e in grado di conferire resistenza all'ospite, opportunamente modificate in modo da risultare bersagli inefficienti del silenziamento genico post-trascrizionale indotto dal virus, per l'ottenimento di piante transgeniche con livelli durevoli di resistenza ai geminivirus.

Infatti nel corso degli esperimenti gli autori dimostrano che il superamento della resistenza, e quindi la difficoltà di ottenere resistenze durevoli ai geminivirus, è dovuto alle inaspettate capacità dei geminivirus di silenziare post-trascrizionalmente il transgene e di

diffondersi in una pianta in cui il transgene, con sequenze omologhe al virus infettante, è silenziato post-trascrizionalmente.

Come mostrato rispettivamente nelle figure 2 e 3, sia nelle piante transgeniche di *N.benthamiana* linea 102.22 che nelle piante di *Pomodoro* 47 x wt la capacità del virus di superare la resistenza è conseguente al silenziamento del transgene da parte del virus stesso ed alla inaspettata capacità del virus di diffondere in una pianta silenziata.

La capacità del TYLCSV di diffondere in una pianta in cui il transgene Rep-210 è silenziato post-trascrizionalmente è ulteriormente circostanziata da quanto riportato nella figura 4.

I risultati mostrano che le piante transgeniche di pomodoro 47 x 10D (Brunetti et al., 1997), silenziate post-trascrizionalmente prima dell'agroinoculazione, come evidenziato dall'assenza della proteina Rep-210 e dalla concomitante presenza dei siRNA omologhi al transgene, sono suscettibili all'infezione di TYLCSV al pari dei controlli.

Quanto sopra dimostra che, contrariamente a quanto accade con virus a RNA, il geminivirus non è bloccato da un attivo silenziamento di sequenze geniche virali.

Quanto sopra evidenziato non è confinato al tipo di pianta transgenica utilizzata o alla metodica di inoculo del virus tramite agroinfezione o *Bemisia tabaci*. Infatti, come mostrato in tabella 3, utilizzando un numero ridotto di bemisie virulifere per pianta, tale da infettare tra il 90% ed il 100% delle piante di controllo, circa il 40% delle piante transgeniche (linea 201) il cui transgene è silenziato post-

trascrizionalmente non si infettano o si infettano in ritardo, mentre ad una più alta concentrazione di inoculo tutte le piante sfidate con insetti viruliferi si infettano in maniera analoga agli esperimenti condotti utilizzando come tecnica di inoculo l'agroinoculazione.

Tabella 3

Analisi molecolare prima dell'inoculo		Bassa concentrazione d'inoculo <sup>a</sup>			Alta concentrazione d'inoculo <sup>b</sup>		
Piante transgeniche		2 <sup>c</sup>	3	6	2	3	6
Rep210 (No)	siRNAs (Si)	6/15	7/15	8/15	16/21	20/21	21/21
Non transgeniche		2 <sup>c</sup>	3	6	2	3	6
Rep210 (No)	siRNAs (No)	11/12	11/12	11/12	8/8	8/8	8/8

a Sette insetti viruliferi per pianta per 2 giorni

b Trentacinque insetti viruliferi per pianta per 5 giorni

c Settimane successive all'inoculo

E' quindi importante tenere in considerazione che le condizioni di agroinoculazione virale utilizzate per saggiare la resistenza e vagliarne la persistenza nel tempo (come mostrato nelle figure 2, 3 e 4 e nelle tabelle 1 e 2) corrispondono a condizioni di alta o altissima pressione virale. Quest'approccio sperimentale permette di identificare piante transgeniche con livelli d'elevatissima resistenza o di immunità all'infezione virale e quindi di elevatissimo valore commerciale.

Quindi, l'introduzione di caratteri di resistenza ai geminivirus mediante l'espressione di sequenze derivate dal patogeno è limitata a

causa della inaspettata capacità dei geminivirus di silenziare post-trascrizionalmente il transgene e di diffondere nella pianta silenziata.

Ulteriormente gli autori dimostrano che i trascritti sia del filamento positivo (V1 e V2) sia di quello negativo ( C1, C2, C3 e C4) del TYLCSV sono oggetto, durante una normale infezione su piante wild type, del silenziamento post-trascrizionale virale, come mostrato nella figura 5. Ciò si traduce di fatto nell'impossibilità di ottenere resistenza duratura mediante espressione di sequenze derivate dal patogeno, a meno che queste non siano opportunamente modificate in modo tale da non risultare bersaglio o da risultare bersaglio inefficiente del silenziamento genico post-trascrizionale indotto dal virus infettante.

Introducendo, invece, nel genoma delle piante una sequenza secondo l'invenzione è possibile ottenere una resistenza ai geminivirus che, a differenza di quella ottenuta con le metodiche note, è duratura.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione una sequenza polinucleotidica codificante per una sequenza amminoacidica derivata dai geminivirus, detta sequenza polinucleotidica essendo mutata in modo tale da non essere bersaglio o da essere bersaglio inefficiente del silenziamento post-trascrizionale virale e avente:

a) un'omologia a livello nucleotidico inferiore o uguale al 90% rispetto alla corrispondente sequenza genica dei geminivirus di cui si vuole ottenere resistenza, preferibilmente inferiore o uguale all'80%, ancora più preferibilmente inferiore o uguale al 70%;

ING. PATRIZIO & ZAPPALÀ ROMA SPA





b) un'omologia continua nell'RNA trascritto, rispetto alla corrispondente sequenza genica dei geminivirus di cui si vuole ottenere resistenza, inferiore o uguale a 17 nucleotidi, preferibilmente inferiore o uguale a 8 nucleotidi;

c) una lunghezza massima della sequenza contenente una singola sostituzione rispetto alla corrispondente sequenza genica dei geminivirus non superiore a 30 nucleotidi, preferibilmente non superiore a 20 nucleotidi;

detta sequenza polinucleotidica essendo in grado di conferire alle piante, loro tessuti o cellule vegetali con essa trasformate una resistenza durevole contro i geminivirus.

Le sequenze polinucleotidiche secondo l'invenzione possono essere wild-type o prodotte sinteticamente o per mutagenesi e le sequenze amminoacidiche derivate dai geminivirus da esse codificate sono sequenze wild-type o mutagenizzate che interferiscono con l'infezione virale.

Come possibili sequenze polinucleotidiche che siano bersaglio inefficiente del silenziamento post-trascrizionale possono essere utilizzate sequenze polinucleotidiche derivate dai geminivirus, opportunamente scelte e/o accorciate in modo tale che dette sequenze, pur mantenendo simili capacità interferenti, siano sottorappresentate, rispetto alle sequenze originali, nella popolazione naturale dei siRNA prodotti dal virus infettante.

Le sequenze geniche rispetto alle quali costruire la sequenza polinucleotidica secondo l'invenzione possono derivare dai

145 (1997) 144-154  
145 (1997) 144-154  
145 (1997) 144-154

geminivirus quali, ad esempio, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus*, *Topocuvirus* ed in particolare possono essere derivate dalle specie riportate nella tabella 4 e loro isolati, più in particolare dalle specie di Tomato yellow leaf curl e loro isolati riportati nella tabella 5.

Tabella 4

Elenco di specie di geminivirus	Acronimo
African cassava mosaic virus	ACMV
Bean calico mosaic virus	BcaMV
Bean dwarf mosaic virus	BDMV
Bean golden mosaic virus	BGMV
Bean golden yellow mosaic virus	BGYMV
Cabbage leaf curl virus	CaLCuV
Chilli leaf curl virus	ChiLCuV
Cotton leaf crumple virus	CLCrV
Cotton leaf curl Alabad virus	CLCuAV
Cotton leaf curl Gezira virus	CLCuGV
Cotton leaf curl Kokhran virus	CLCuKV
Cotton leaf curl Multan virus	CLCuMV
Cotton leaf curl Rajasthan virus	CLCuRV
Cowpea golden mosaic virus	CPGMV
Cucurbit leaf curl virus	CuLCuV
East African cassava mosaic Cameroon virus	EACMCV
East African cassava mosaic Malawi virus	EACMMV
East African cassava mosaic virus	EACMV
East African cassava mosaic Zanzibar virus	EACMZV

Indian cassava mosaic virus	ICMV
Ipomea yellow vein virus	IYVV
Melon chlorotic leaf curl virus	MCLCuV
Mungbean yellow mosaic India virus	MYMIV
Mungbean yellow mosaic virus	MYMV
Okra yellow vein mosaic virus	OYVMV
Papaya leaf curl virus	PaLCuV
Pepper golden mosaic virus	PepGMV
Pepper huasteco yellow vein virus	PHYVV
Pepper leaf curl Bangladesh virus	PepLCBV
Pepper leaf curl virus	PepLCV
Potato yellow mosaic Panama virus	PYMPV
Potato yellow mosaic Trinidad virus	PYMTV
Potato yellow mosaic virus	PYMV
South African cassava mosaic virus	SACMV
Soybean crinkle leaf virus	SbCLV
Squash leaf curl China virus	SLCCNV
Squash leaf curl virus	SLCV
Squash leaf curl Yunnan virus	SLCYV
Squash mild leaf curl virus	SMLCV
Squash yellow mild mottle virus	SYMMoV
Sri Lankan cassava mosaic virus	SLCMV
Sweet potato leaf curl Georgia virus	SPLCGV
Sweet potato leaf curl virus	SPLCV
Tobacco curly shoot virus	TbCSV

Tobacco leaf curl Japan virus	TbLCJV
Tobacco leaf curl Kochi virus	TbLCKoV
Tobacco leaf curl Yunnan virus	TbLCYNV
Tobacco leaf curl Zimbabwe virus	TbLCZV
Tomato chlorotic mottle virus	ToCMoV
Tomato golden mosaic virus	TGMV
Tomato golden mottle virus	ToGMoV
Tomato leaf curl Bangalore virus	ToLCBV
Tomato leaf curl Bangladesh virus	ToLCBDV
Tomato leaf curl Gujarat virus	ToLCGV
Tomato leaf curl Karnataka virus	ToLCKV
Tomato leaf curl Laos virus	ToLCLV
Tomato leaf curl Malaysia virus	ToLCMV
Tomato leaf curl New Delhi virus	ToLCNDV
Tomato leaf curl Sri Lanka virus	ToLCSLV
Tomato leaf curl Taiwan virus	ToLCTWV
Tomato leaf curl Vietnam virus	ToLCVV
Tomato leaf curl virus	ToLCV
Tomato mosaic Havana virus	ToMHV
Tomato mottle Taino virus	ToMoTV
Tomato mottle virus	ToMoV
Tomato rugose mosaic virus	ToRMV
Tomato severe leaf curl virus	ToSLCV
Tomato severe rugose virus	ToSRV
Tomato yellow leaf curl China virus	TYLCCNV

ING. BAZZANO & ZAMBINO ROMA SPA



Tomato yellow leaf curl Gezira virus	TYLCGV
Tomato yellow leaf curl Malaga virus	TYLCMaIV
Tomato yellow leaf curl Sardinia virus	TYLCSV
Tomato yellow leaf curl Thailand virus	TYLCTHV
Tomato yellow leaf curl virus	TYLCV
Watermelon chlorotic stunt virus	WmCSV
Wheat dwarf virus	WDV
Maize streak virus	MSV
Sugarcane streak virus	SSV
Bean yellow dwarf virus	BYDV
Tobacco yellow dwarf virus	TYDV
Tomato pseudo curly top virus	TPCTV
Beet curly top virus	BCTV

### Tabella 5

Specie di tomato yellow leaf curl (Fauquet <i>et al.</i> , 2003)	Acronimo
<i>Tomato yellow leaf curl China virus</i>	TYLCCNV
Tomato yellow leaf curl China virus AF311734	TYLCCNV
Tomato yellow leaf curl China virus – [Y64] AJ457823	TYLCCNV-[Y64]
Tomato yellow leaf curl China virus – Tb [Y10] AJ319675	TYLCCNV- Tb[Y10]
Tomato yellow leaf curl China virus – Tb [Y11] AJ319676	TYLCCNV- Tb[Y11]
Tomato yellow leaf curl China virus – To [Y25] AJ457985	TYLCCNV- Tb[Y25]

10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737  
738  
739  
740  
741  
742  
743  
744  
745  
746  
747  
748  
749  
750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
760  
761  
762  
763  
764  
765  
766  
767  
768  
769  
770  
771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
800  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
810  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819  
820  
821  
822  
823  
824  
825  
826  
827  
828  
829  
830  
831  
832  
833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846

Tomato yellow leaf curl China virus – Tb [Y36] AJ420316	TYLCCNV- Tb[Y36]
Tomato yellow leaf curl China virus – Tb [Y38] AJ420317	TYLCCNV- Tb[Y38]
Tomato yellow leaf curl China virus – Tb [Y5] AJ319674	TYLCCNV-Tb[Y5]
Tomato yellow leaf curl China virus – Tb [Y8] AJ319677	TYLCCNV-Tb[Y8]
<i>Tomato yellow leaf curl Gezira virus</i>	TYLCGV
Tomato yellow leaf curl Gezira virus – [1] AY044137	TYLCGV-[1]
Tomato yellow leaf curl Gezira virus – [2] AY044138	TYLCGV-[2]
Tomato yellow leaf curl Gezira virus – [Shambat] AY044139	TYLCGV-[Sha]
<i>Tomato yellow leaf curl Malaga virus</i>	TYLCMaIV
Tomato yellow leaf curl Malaga virus AF271234	TYLCMaIV
<i>Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i>	TYLCSV
Tomato yellow leaf curl Sardinia virus X61153	TYLCSV
Tomato yellow leaf curl Sardinia virus – Spain [1] Z25751	TYLCSV-ES[1]
Tomato yellow leaf curl Sardinia virus – Spain [2] L27708	TYLCSV-ES[2]
Tomato yellow leaf curl Sardinia virus – Sicily Z28390	TYLCSV-Sic
<i>Tomato yellow leaf curl Thailand virus</i>	TYLCTHV
Tomato yellow leaf curl Thailand virus – [1] X63015, X63016	TYLCTHV-[1]
Tomato yellow leaf curl Thailand virus – [2] AF141922, AF141897	TYLCTHV-[2]

D

curl (SPLCGV, SPLCV), Tobacco leaf curl (TbLCJV, TbLCKoV, TbLCYNV, TbLCZV), Tomato leaf curl (ToLCBV, ToLCBDV, ToLCGV, ToLCKV, ToLCLV, ToLCMV, ToLCNDV, ToLCSLV, ToLCTWV, ToLCVW, ToLCV) e loro isolati.

Altre specie di geminivirus preferite, appartenenti agli altri generi *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus*, sono WDV, MSV, SSV, BYDV, TYDV, BCTV e loro isolati.

La sequenza genica appartenente al genoma dei geminivirus può essere la sequenza C1/AL1/AC1, C2/AL2/AC2, C3/AL3/AC3, C4/AL4/AC4, V1/AR1/AV1, V2/AR2/AV2, BC1/BL1 e BV1/BR1, in particolare, la sequenza C1/AL1/AC1 dei geminivirus precedentemente descritti e loro isolati.

La sequenza amminoacidica codificata dalla sequenza polinucleotidica oggetto della presente invenzione è una proteina derivata dal patogeno in grado di conferire resistenza contro i geminivirus alle piante che la esprimono, poiché detta proteina interferente viene espressa in modo stabile contribuendo a conferire una resistenza durevole indipendentemente dal meccanismo molecolare con cui il prodotto proteico è capace di indurre resistenza.

La proteina derivata dal patogeno può essere una proteina del capsido, la proteina virale associata alla replicazione (Rep), le proteine codificate dai geni C2/AL2/AC2, C3/AL3/AC3, C4/AL4/AC4, V2/AR2/AV2, BC1/BL1 e BV1/BR1.

Un esempio di possibile sequenza polinucleotidica che soddisfi i requisiti sopra citati è riportato nella figura 13 che mostra

ING. PARZANO & ZANNO RONA SpA





l'allineamento fra la sequenza nucleotidica wild-type codificante la proteina Rep210 del TYLCSV e la sequenza nucleotidica sintetica modificata in modo tale da non essere bersaglio della degradazione post-trascrizionale indotta dal virus infettante, dove entrambe le sequenze nucleotidiche codificano esattamente lo stesso prodotto proteico.

Le piante, i loro tessuti o le cellule vegetali che possono essere trasformate con dette sequenze polinucleotidiche possono essere pomodoro, peperone, tabacco, patata dolce, cotone, melone, zucchini, manioca, patata, fagiolo, soia, vigna, zucchini, barbabietola, canna da zucchero, mais, frumento.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione un costrutto comprendente una sequenza polinucleotidica eterologa contenente in direzione 5'-3':

- a) una sequenza polinucleotidica funzionante come promotore in detta pianta o tessuto o cellule trasformate;
- b) una sequenza polinucleotidica non tradotta posizionata al 5' della regione codificante, appartenente o meno alla regione intergenica di geminivirus;
- c) una sequenza polinucleotidica secondo l'invenzione sopra definita o un suo frammento o una sua variante;
- d) una sequenza funzionante come terminatore della trascrizione, posizionata in 3' rispetto a detta sequenza polinucleotidica.

Ulteriore oggetto della presente invenzione è un vettore di espressione che comprende il costrutto precedentemente descritto.

Handwritten text: *Handwritten text, possibly a signature or date, oriented vertically on the right margin.*

Inoltre, costituisce oggetto della presente invenzione una pianta, un tessuto o cellule vegetali transgeniche, la loro progenie nonché i semi comprendenti nel loro genoma una sequenza polinucleotidica secondo la presente invenzione.

Infine, forma oggetto della presente invenzione un metodo per la preparazione di piante transgeniche, loro tessuti o cellule vegetali resistenti in maniera duratura ai geminivirus che comprende le seguenti fasi:

a) identificazione o scelta di una sequenza genica virale codificante per una sequenza amminoacidica in grado di conferire resistenza ai geminivirus;

b) mutagenesi della sequenza genica virale in modo tale da renderla un bersaglio inefficiente del silenziamento post-trascrizionale indotto dal virus infettante;

c) inserimento della sequenza genica di geminivirus mutata ottenuta nella fase b) mediante un costrutto come descritto precedentemente, nella pianta, suo tessuto o cellula vegetale.

In riferimento alla fase a) del metodo secondo la presente invenzione, con il termine "identificazione" si intende l'individuazione sperimentale di detta sequenza genica virale in grado di conferire resistenza ai geminivirus, mentre con il termine "scelta" si intende l'individuazione di una sequenza genica virale già disponibile in grado di conferire resistenza non durevole ai geminivirus. In questo senso il metodo secondo la presente invenzione si configura ulteriormente

come la soluzione al problema della perdita della resistenza ai geminivirus che si verifica mediante l'impiego di sequenze note.

In particolare la mutagenesi prevista nella fase b) viene effettuata mantenendo un'omologia a livello nucleotidico rispetto alla corrispondente sequenza genica dei geminivirus di cui si vuole ottenere resistenza inferiore o uguale al 90%, preferibilmente inferiore o uguale all'80%, ancora più preferibilmente inferiore o uguale al 70%, distribuita in modo tale che l'omologia continua nell'RNA trascritto rispetto alla corrispondente sequenza dei geminivirus sia inferiore o uguale 17 nucleotidi, preferibilmente inferiore o uguale a 8 nucleotidi e la lunghezza massima della sequenza contenente una singola sostituzione rispetto alla sequenza genica nativa non sia superiore a 30 nucleotidi, preferibilmente non superiore a 20 nucleotidi.

Per quanto concerne la sequenza amminoacidica codificata dalla sequenza polinucleotidica identificata o scelta nella fase a) secondo la presente invenzione, essa può essere una proteina avente omologia del 100% rispetto alla proteina virale wild-type.

Tale intervento di mutagenesi consiste in tutte quelle mutazioni sulla sequenza nucleotidica che non diminuiscano la capacità della proteina nel conferire resistenza a geminivirus. Possibili mutazioni sono sia quelle puntiformi silenti che quelle che portano alla sostituzione con amminoacidi aventi caratteristiche biochimiche simili, o delezioni e/o inserzioni e/o sostituzioni.

Alternativamente la mutagenesi nella fase b) del metodo secondo la presente invenzione consiste in delezioni della sequenza

polinucleotidica alla/e sua/e estremità in modo tale che detta sequenza, pur mantenendo simili capacità interferenti, sia sottorappresentata, rispetto alla sequenza originale, nella popolazione naturale dei siRNA prodotti dal virus infettante.

In particolare, tale intervento di mutagenesi nella fase b) del metodo secondo la presente invenzione può consistere in delezioni della regione 3' della sequenza genica virale fino all'identificazione della minima regione 5' di detta sequenza genica che sia sottorappresentata rispetto alla sequenza codificante la proteina wild-type, nella popolazione dei siRNA interferenti e che detta proteina tronca mantenga la capacità di conferire resistenza ai geminivirus.

Inoltre, la sequenza genica virale della fase a) del metodo secondo la presente invenzione può essere quella del gene C1/AL1/AC1 di TYLCSV e la sequenza amminoacidica può essere una proteina tronca rispetto alla proteina virale wild-type quale, ad esempio, la Rep-130.

Tra le molteplici applicazioni in campo agronomico delle sequenze polinucleotidiche sintetiche secondo la presente invenzione è di particolare interesse il loro impiego per l'ottenimento di piante di pomodoro resistenti al TYLCSV.

In questa particolare forma di realizzazione, la sequenza polinucleotidica transgenica codificante per la proteina virale Rep tronca, (Rep-210) è stata modificata mediante una delezione al 3', risultando bersaglio inefficiente del silenziamento genico post-

ING. BARTOLO G. ZANARDI ROMA SPA



trascrizionale indotto dal TYLCSV, pur mantenendo la capacità di conferire resistenza.

In particolare, è stata individuata tramite ibridazioni stringenti con sonde radioattive ad RNA, una regione trascritta del genoma del TYLCSV che è sottorappresentata nella popolazione dei siRNA di origine virale prodotti durante l'infezione del TYLCSV in piante wild type, come mostrato in figura 6. Tale regione è quella corrispondente ai primi 390-nucleotidi del gene codificante la Rep del TYLCSV, che una volta trascritta è bersaglio inefficiente del silenziamento genico post-trascrizionale, e che codifica per la proteina Rep tronca (Rep-130) espressa in modo stabile, dando così luogo ad una resistenza durevole.

Pertanto, in una forma particolare di realizzazione dell'invenzione, la sequenza amminoacidica dei geminivirus, quale ad esempio il TYLCSV, codificata dalla sequenza polinucleotidica secondo l'invenzione può essere la proteina tronca Rep 130.

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione, con particolare riferimento alle figure dei disegni allegati, in cui:

la figura 1 mostra il genoma del virus dell'accartocciamento fogliare giallo del pomodoro specie Sardegna (TYLCSV). Il DNA è trascritto bidirezionalmente e contiene sei moduli di lettura parzialmente o totalmente sovrapposti (ORF) di cui due sul filamento virale (V) V1 e V2 e quattro sul filamento complementare (C) C1, C2, C3 e C4;

la figura 2 mostra l'espressione della proteina Rep-210 in piante transgeniche di *N. benthamiana* (linea 102.22) in seguito all'agroinoculazione con TYLCSV. I simboli (-), (+) e NI indicano rispettivamente piante sane, infette e non inoculate. L'analisi è stata condotta prima dell'agroinoculazione con TYLCSV (0wpi), quattro e otto settimane dopo di essa (rispettivamente 4 e 8 wpi);

la figura 3 mostra l'espressione della proteina Rep-210 e degli mRNA transgenici in piante di pomodoro (linea 47 X wt) prima dell'agroinoculazione con TYLCSV (0 wpi) e 22 settimane dopo essa (22 wpi). I simboli (+) e (-) indicano rispettivamente piante che risultavano infette o sane al tempo indicato;

la figura 4 mostra l'analisi dell'espressione della proteina Rep-210 e dei siRNA corrispondenti al relativo trascritto in piante transgeniche di pomodoro della linea 47 X 10D prima dell'agroinoculazione con TYLCSV. I simboli (+) e (-) sopra il pannello indicano rispettivamente la presenza e l'assenza del transgene C1 senso e antisenso; wt indica una pianta wild-type di controllo; mentre i simboli (+), (-) e NI sotto il pannello dei siRNA indicano rispettivamente la presenza (+) e l'assenza (-) del virus e la non agroinoculazione (NI) come controllo;

la figura 5 mostra il Northern blot degli RNA totali estratti da piante di pomodoro wild-type infettate da TYLCSV (campioni 1-4) e non infettate come controllo (campione C); M indica un marcatore di pesi molecolari;

la figura 6 mostra l'analisi della presenza dei siRNA in piante wild-type di pomodoro agroinoculate con il TYLCSV (campioni 1 e 2) a quattro settimane dall'inoculazione e wild-type non agroinoculate (campione C); in particolare sono analizzati i siRNA corrispondenti al trascritto per la Rep210 (sonda A) e per la Rep130 (sonda B);

la figura 7 mostra la sequenza nucleotidica codificante la Rep-130 presente nel plasmide pTOM130. In maiuscolo sono riportati i nucleotidi non appartenenti al TYLCSV, ma derivanti dal clonaggio; le sequenze sottolineate corrispondono ai siti di restrizione BamHI e EcoRI usati per il clonaggio. I codoni di inizio e terminazione sono riportati in grassetto mentre le mutazioni introdotte per eliminare l'espressione della proteina C4 sono sottolineate in corsivo e grassetto;

la figura 8 mostra il Southern blot di acidi nucleici totali estratti da protoplasti di *N. benthamiana* wild-type cotransfettati con un clone infettivo di TYLCSV (pTOM6), insieme al plasmide esprimente la forma mutata della proteina Rep indicata sopra ciascuna colonna;

la figura 9 mostra l'analisi quantitativa della replicazione del TYLCSV in protoplasti di *N. benthamiana* wild-type cotransfettati con il plasmide pTOM6 insieme al plasmide esprimente la forma mutata della proteina Rep;

la figura 10 mostra lo schema del plasmide pTOM130, impiegato per l'ottenimento delle piante transgeniche esprimenti la Rep-130. LB e RB indicano rispettivamente left-border e right-border; pE35S rappresenta il promotore duplicato del 35S del Virus del Mosaico del Cavolfiore; Rep-130 è la sequenza codificante la proteina

Rep-130; t35S è il terminatore del 35S del Virus del Mosaico del Cavolfiore; tNOS è il terminatore del gene codificante per la nopalina sintasi; nptII è la sequenza codificante la neomicina fosfotransferasi; pNOS indica il promotore del gene per la nopalina sintasi; Kan rappresenta il gene per la resistenza alla kanamicina per la selezione in *E.coli*;

la figura 11 mostra l'analisi dell'espressione della proteina Rep-130 in piante transgeniche di *N. benthamiana* trasformate con pTOM130 (linee 300-309) o wild-type (wt);

la figura 12 mostra l'analisi della replicazione del TYLCSV in protoplasti di *N. benthamiana* transgenici esprimenti la Rep-130 (linee 300, 301, 303) la Rep-210 (102.22) e wild-type (wt);

la figura 13 mostra l'allineamento fra la sequenza nucleotidica wild-type codificante la proteina Rep210 del TYLCSV (Seq\_cod\_Rep210\_wild\_type, in alto) e la sequenza nucleotidica sintetica modificata in modo tale da non essere bersaglio della degradazione post-trascrizionale indotta dal virus infettante (Seq\_cod\_Rep210\_silencing\_minus, in basso). Nella sequenza sintetica, i nucleotidi mutati rispetto alla sequenza wild type sono indicati dall'ombreggiatura.

ESEMPIO 1: Identificazione di una regione del gene C1 del TYLCSV sottorappresentata nella popolazione dei piccoli RNA interferenti.

In una infezione naturale da parte di TYLCSV in piante wild-type, le sequenze virali trascritte sia del filamento negativo che positivo

ING. DOTT. G. ZUCCHETTI





del genoma di TYLCSV sono bersaglio di silenziamento genico post-trascrizionale come evidenziato dalla presenza di siRNA omologhi a differenti porzioni del genoma, rilevabile nella figura 5. In figura 5 è riportato il Northern blot di RNA totali estratti dalle piante di pomodoro wild-type infette da TYLCSV (campioni 1-4) e non infette di controllo (campione C). In particolare, a lato di ciascun pannello è schematizzata la sonda usata e sono indicati i siti di restrizione utilizzati. Sono riportate anche le dimensioni stimate dei siRNA.

Per identificare una regione del gene C1 del TYLCSV sottorappresentata nella popolazione dei siRNA sono stati estratti gli RNA totali (Brunetti *et al.*, 1997) sia da piante di pomodoro sane che infette da TYLCSV.

Trenta microgrammi di tali RNA sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel denaturante di poliacrilamide 8% e trasferiti per capillarità su filtro di nylon mediante Northern blot. Sono state prodotte due repliche identiche ed è stata effettuata per ciascuna un'ibridazione con sonde corrispondenti a differenti porzioni della regione 5' del gene C1, come mostrato nella figura 6. Un filtro è stato ibridizzato con una sonda derivata dalla porzione 5' del gene C1 comprendente 42 nt di sequenza leader non tradotta e i primi 630 nucleotidi del gene C1 (circa i 3/5 del gene C1) (sonda A) e l'altro con una sonda derivata dalla porzione 5' del gene C1 comprendente 42 nt di sequenza leader non tradotta ed i primi 390 nucleotidi del gene C1 (sonda B).

Al fine di poter confrontare a livello quantitativo i risultati ottenuti con le due diverse sonde (derivanti da due marcature

indipendenti), quantità scalari di uno stesso oligonucleotide lungo 40 nt complementare ad entrambe le sonde sono state caricate su entrambe le repliche. Le colonne 100 e 50 corrispondono rispettivamente a 100 e 50 picogrammi di tale oligonucleotide. I pannelli contenenti la migrazione dell'oligonucleotide sono stati posti accanto ai rispettivi pannelli contenenti i siRNA, ma la posizione in figura non corrisponde alla posizione sul gel, in quanto l'oligonucleotide e i siRNA hanno peso molecolare differente.

Entrambe le sonde dopo la trascrizione *in vitro* sono state sottoposte ad idrolisi alcalina (Cox *et al.*, 1984) al fine di ridurle in frammenti di lunghezza media pari a 75 nucleotidi.

Le ibridazioni sono state condotte per 16 ore a 39°C nel tampone descritto da (Dalmay *et al.*, 2000). Dopo l'ibridazione i filtri sono stati lavati in 2X SSC, 0,2% SDS due volte per 10 minuti a 40°C, due volte per 10 minuti a 45°C e una volta per 10 minuti a 50°C.

Si può notare come la regione 5' prossimale del gene C1 sia sottorappresentata nella popolazione dei siRNA. In particolare l'analisi quantitativa dei risultati effettuata mediante lo strumento TYPHOON (Amersham-Pharmacia) ha messo in evidenza che i siRNA corrispondenti a questa regione 5' sono in quantità pari al 25% rispetto a quelli corrispondenti alla regione che si estende fino ai nucleotidi codificanti l'aminoacido 210. Detta regione 5' costituisce quindi un bersaglio inefficiente per il silenziamento genico post-trascrizionale indotto dal virus infettante.

ESEMPIO 2: *Costruzione di una sequenza polinucleotidica della porzione 5' del gene C1 codificante la Rep tronca.*

Come evidenziato precedentemente (Brunetti *et al.*, 1997), le piante transgeniche Rep-210 mostrano una resistenza non durevole ed un fenotipo alterato.

All'interno del gene C1 tronco è presente, in un differente modulo di lettura, il gene C4, come si può notare in figura 1.

E' stato dimostrato che l'espressione transgenica del gene C4 dei geminivirus induce alterazioni del fenotipo (Krake *et al.*, 1998).

Sono stati quindi progettati diversi costrutti C1 tronchi che non potessero più esprimere la ORF C4.

Per ottenere i mutanti C4(-) è stato introdotto un codone di terminazione nella sequenza C4 attraverso l'introduzione di due mutazioni puntiformi. In particolare, riferendosi alla sequenza del pTOM130 riportata nella figura 7, la mutazione al nucleotide in posizione 233, consiste in una trasversione da C a G che converte il codone TCA (codificante per la serina) del modulo di lettura codificante la C4 in TGA (opal). Inoltre, la mutazione al nucleotide in posizione 231 consiste in una transizione da C a T che ripristina nel modulo di lettura codificante la C1 un codone codificante per la leucina (CTC diventa TTG, molto più rappresentato in pianta).

In questo modo la traduzione della proteina C4 viene interrotta dopo soli 10 amminoacidi, mentre la sequenza amminoacidica della proteina C1 rimane invariata. Le due mutazioni introdotte sono state scelte fra le tante possibili in base al criterio di creare un codone di

Fig. 7. Sequenza nucleotidica della regione 5' del gene C1 del geminivirus Rep-210. La sequenza è divisa in due moduli di lettura, C1 e C4, separati da un frame shift. La mutazione al nucleotide 233 (C → G) converte il codone TCA (serina) in TGA (opal). La mutazione al nucleotide 231 (C → T) converte il codone CTC (leucina) in TTG (leucina).

terminazione "forte" nel modulo di lettura della C4, mantenendo nel modulo di lettura della C1 un codone per la leucina compatibile con i codoni in uso nelle piante.

La mutagenesi è stata effettuata mediante PCR con i seguenti oligonucleotidi mutati:

C4 plus.primers: 5'-CT CAT CTC CAT ATT ITG ATC CAA TTC  
GAA G-3'

C4 minus.primers: 5'-C TTC GAA TTG GAT CAA AAT ATG  
GAG ATG AG-3' ( 2419-2448 in TYLCV - Kheyr-Pour *et al.*, 1991)

Ciascuno dei due primer mutati è stato utilizzato insieme ad un primer esterno in due reazioni separate di PCR utilizzando come stampo il plasmide pGEM102 (Brunetti *et al.*, 2001).

In particolare, gli oligonucleotidi esterni utilizzati sono Rev e Univ (M13/pUC primer sequenziamento n.1233 e 1224) e dalla reazione condotta con Univ/C4plus si ottiene un frammento di 537 bp, mentre dalla reazione con Rev/C4minus si ottiene un frammento di 351 bp.

I prodotti così ottenuti sono stati usati come stampo per una successiva reazione d'amplificazione condotta con due primer esterni.

Il prodotto di PCR così ottenuto è stato digerito con gli enzimi di restrizione EcoRI e BamHI e clonato nei corrispondenti siti di pJIT60, ottenendo pJITR210. In entrambi i casi si è proceduto al sequenziamento per verificare l'esattezza dei cloni.

ING. BARZANO & ZANARDI ROMA SPA



ESEMPIO 3: *Identificazione della minima regione 5' del gene C1 del TYLCSV che una volta espressa in cellule vegetali sia in grado di inibire la replicazione virale.*

Al fine di definire la minima regione 5' terminale del gene C1 in grado di conferire resistenza al TYLCSV, una serie di mutanti di delezione 3'-terminali del gene C1 è stata clonata nel vettore d'espressione pJIT60, dando origine alla serie pJTR.

Le sequenze virali sono state amplificate mediante PCR con Pfu DNA polimerasi (Stratagene), utilizzando primer specifici contenenti siti di restrizione alle estremità.

Come stampo è stato utilizzato il plasmide precedentemente descritto pJTR210 che codifica per la Rep-210, contenente un codone di stop per la proteina interna C4. I frammenti ottenuti dalle reazioni di amplificazione sono stati digeriti con gli enzimi *Bam*HI e *Eco*RI e clonati nei corrispondenti siti di pJIT60, dando origine alla serie pJTR.

Tutti i cloni finali sono stati sequenziati per confermare la fedeltà dell'amplificazione e le giunzioni vettore-inserito. La lunghezza e le posizioni esatte di ciascuna sequenza amplificata sono riportate nella tabella 6.

La capacità di ciascun mutante di delezione della Rep di conferire resistenza al TYLCSV è stata valutata mediante saggi di cotrasfezione di protoplasti wild-type di *N. benthamiana* con un clone infettivo di TYLCSV (pTOM6), insieme a ciascun mutante e successiva analisi del livello di replicazione del genoma virale mediante Southern blot. I risultati ottenuti sono riportati nelle figure 8 e 9.

1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024, 2025

Tabella 6

pJTR210a	42 bp UTR + C1 ORF tronca (630 nt) contenente la regione codificante C4	1985-2656 (1)
pJTR210	42 bp UTR + C1 ORF tronca (630 nt)	1985-2656 (1)
pJTR181	42 bp UTR + C1 ORF tronca(543 nt)	2072-2656 (1)
pJTR156	42 bp UTR +C1 ORF tronca (468 nt)	2147-2656 (1)
pJTR130	42 bp UTR + C1 ORF tronca(390 nt)	2225-2656 (1)
pJTR120	42 bp UTR + C1 ORF tronca (360 nt)	2255-2656 (1)
pJTR80	42 bp UTR + C1 ORF tronca (240 nt)	2375-2656 (1)
pJTR54	42 bp UTR + C1 ORF tronca (162 nt)	2453-2656 (1)

(1) numerazione nucleotidica del genoma del TYLCSV secondo Kheyr-Pour *et al.* 1991. La cotrasfezione dei protoplasti, l'estrazione di acidi nucleici totali e l'analisi Southern sono state eseguite secondo metodiche già descritte (Brunetti *et al.* 2001).

Gli acidi nucleici totali estratti da ciascun campione di protoplasti sono stati analizzati mediante Southern blot con una sonda ad RNA marcato con digossigenina corrispondente alla sequenza codificante la Rep-210, ed il plamide pGEM-P è stato utilizzato come controllo. In particolare nella figura 8 è mostrato il Southern blot degli acidi nucleici totali estratti, dove scDNA e ssDNA indicano rispettivamente la forma superavvolta e a singolo filamento del DNA del TYLCSV.

Per effettuare l'analisi quantitativa accurata dell'effetto dell'espressione delle varie forme tronche di Rep sulla replicazione del genoma di TYLCSV, l'analisi Southern è stata effettuata con una sonda

di DNA marcata con  $^{32}\text{P}$  corrispondente alla regione codificante i primi 54 amino acidi N-terminali della Rep ed è stato valutato il livello di radioattività corrispondente a ciascuna banda osservata su filtro, mediante analisi con lo strumento Instant Imager (Canberra, Packard).

Ciascun costrutto mutato è stato saggiato due volte, in tre esperimenti indipendenti ed ogni valore riportato nella figura 9 rappresenta la media di due o tre cotrasfezioni dei tre esperimenti indipendenti.

Come livello di replicazione di TYLCSV pari al 100% è stato assunto quello della replicazione del TYLCSV negli esperimenti di cotrasfezione effettuati con pTOM6 insieme al plasmide di controllo pGEM-P.

In particolare nella figura 9 è mostrata l'analisi quantitativa e le barre bianche e nere degli istogrammi rappresentano rispettivamente la quantità di DNA superavvolto e a singolo filamento; la barra degli errori indica la deviazione standard della media.

Come si rileva dall'osservazione delle figure 8 e 9 i primi 130 amino acidi N-terminali della proteina Rep sono sufficienti ad inibire la replicazione virale in modo pressochè assoluto, mentre l'espressione dei primi 120 amino acidi N-terminali non è influente rispetto ad essa.

ESEMPIO 4: *Ottenimento di piante transgeniche di N. benthamiana esprimenti la Rep-130.*

L'analisi della capacità di inibire la replicazione del TYLCSV da parte delle varie forme mutate della Rep, valutata tramite espressione transiente in protoplasti, ha evidenziato, come descritto nell'esempio

precedente, che il mutante più corto ancora efficace è quello codificante la Rep-130.

E' stato altresì evidenziato precedentemente negli altri esempi che la porzione 5' prossimale del gene C1 codificante la Rep130 è un bersaglio inefficiente del silenziamento genico post-trascrizionale comparato alla sequenza codificante la Rep-210.

Si è pertanto proceduto all'ottenimento di piante transgeniche di *N. benthamiana* esprimenti la Rep-130; a tal fine è stato costruito il plasmide pTOM130 rappresentato nella figura 10, clonando il frammento *KpnI-BglII* di pJTR130 nei siti *KpnI-BamHI* di pBIN19.

La *N. benthamiana* è stata trasformata con il ceppo di *Agrobacterium tumefaciens* C58 pGV2260 contenente il plasmide pTOM130 e le piante resistenti alla kanamicina sono state rigenerate come descritto (Noris *et al.* 1996).

I trasformanti primari sono stati analizzati per la presenza del transgene mediante analisi PCR e per l'espressione della proteina Rep-130 mediante Western blot come mostrato nella figura 11.

Gli estratti proteici ottenuti dalle piante transgeniche (300-309) o wild-type di controllo (wt) sono stati analizzati mediante Western blot usando come anticorpo primario un policlonale di coniglio anti-TYLCSV Rep come descritto (Noris *et al.* 1996).

ESEMPIO 5: Cellule di pianta trasformate stabilmente con il costruito pTOM130 ed esprimenti la Rep-130 inibiscono la replicazione del TYLCSV.

ING. BARBARO & ZANARDI ROMA SPA





Al fine di valutare precocemente la resistenza conferita dall'espressione stabile della Rep-130, protoplasti isolati da vari trasformanti primari di *N. benthamiana* per la Rep-130 sono stati trasfettati con il clone infettivo di TYLCSV (pTOM6).

Le linee transgeniche utilizzate sono state scelte secondo il criterio dell'elevato livello d'espressione della Rep-130, come evidenziato dall'analisi mediante Western blot riportata nella figura 11.

Il livello di replicazione del TYLCSV in tali protoplasti transgenici è stato confrontato con quello osservato in protoplasti di *N. benthamiana* wild-type e transgenici esprimenti la Rep-210 (linea cellulare 102.22).

In particolare nella figura 12 è mostrata l'analisi della replicazione del TYLCSV in protoplasti di *N. benthamiana* transgenici esprimenti la Rep-130 (linee 300, 301, 303), o la Rep-210 (linea 102.22) e wild-type (wt).

Gli acidi nucleici totali estratti dai vari campioni di protoplasti sono stati analizzati mediante Southern blot utilizzando una sonda ad RNA marcata con digossigenina corrispondente al trascritto per la Rep-210.

Al fine di confrontare il livello di replicazione del TYLCSV nei protoplasti transgenici per la Rep-130 con quello osservato nei protoplasti wild-type, gli acidi nucleici totali estratti da questi ultimi sono stati analizzati sul gel anche in diluzioni 1:10 e 1:50., come mostrato nella figura 12.

ESEMPIO 6: Dimostrazione della resistenza duratura al TYLCSV delle piante transgeniche per il costrutto pTOM130 esprimenti la Rep-130.

Al fine di valutare la stabilità nel tempo della resistenza al TYLCSV conferita dall'espressione della Rep-130, le piante transgeniche R1 esprimenti tale proteina sono state agroinoculate con il ceppo di *A. tumefaciens* LBA4404 contenente il clone infettivo di TYLCSV.

Come già esposto in precedenza, le condizioni d'inoculazione virale mediante agroinoculazione, utilizzate per saggiare la resistenza e vagliarne la stabilità nel tempo, corrispondono a condizioni di alta o altissima pressione virale.

L'eventuale instaurarsi dell'infezione è stata valutata ad intervalli di una settimana mediante saggio "tissue printing", utilizzando una sonda marcata con digossigenina specifica per il gene della proteina di rivestimento.

I risultati sono riportati in tabella 7 e mostrano che, a differenza dei risultati descritti nella tabella 2 concernenti piante transgeniche esprimenti la Rep-210 che avevano una resistenza poco durevole nel tempo, le piante transgeniche di *Nicotiana benthamiana* esprimenti la proteina Rep-130 mostrano una resistenza durevole quando agroinoculate con un clone infettivo del genoma del TYLCSV. Questo si può evincere confrontando le piante resistenti a 2 wpi ed a 6 wpi, dove wpi indica il numero di settimane successive all'inoculo.

ING. DANIELLO ZAPPALÀ

Tabella 7

Piante	Tempo (settimane)	N° piante infette/ piante inoculate	% piante infette/ piante inoculate
Rep-130	2	0/10	0
	4	0/10	0
	6	0/10	0
Wild type	2	9/10	90
	4	10/10	100

La resistenza è quindi associata alla presenza della proteina Rep-130 e alla capacità della pianta transgenica inoculata con il TYLCSV di esprimere in maniera durevole la Rep-130, in quanto la sequenza codificante tale prodotto risulta essere un bersaglio inefficiente del silenziamento genico post-trascrizionale indotto dal virus e la proteina Rep seppure mutata mantiene la sua capacità di conferire resistenza all'ospite.

ESEMPIO 7: *Costruzione di una sequenza polinucleotidica sintetica modificata in modo tale da non essere bersaglio della degradazione post-trascrizionale indotta dal virus infettante, codificante la proteina Rep210 del TYLCSV.*

Al fine di ottenere la produzione stabile della proteina Rep210 del TYLCSV da parte di piante transgeniche, è stata costruita una sequenza polinucleotidica sintetica in grado di codificare la proteina Rep210 senza incorrere nella degradazione post-trascrizionale indotta dal virus infettante.

La sequenza polinucleotidica sintetica è stata disegnata in modo tale da soddisfare il requisito di non essere bersaglio della degradazione post-trascrizionale indotta dal virus infettante impiegando il metodo secondo la presente invenzione.

Inoltre, sono stati seguiti i seguenti criteri:

- la sequenza polinucleotidica sintetica non è in grado di codificare il prodotto proteico C4, avendo in posizione 231 e 233 le stesse mutazioni mostrate nella figura 7, come descritto per la Rep130;
- le mutazioni introdotte sono tutte silenti, vale a dire che il prodotto proteico codificato dalla sequenza polinucleotidica sintetica è esattamente uguale a quello codificato dalla sequenza virale wild type;
- le mutazioni introdotte tengono conto della frequenza con cui i vari codoni che specificano per uno stesso aminoacido sono presenti nei geni del pomodoro; in particolare ogni volta che ciò è stato possibile si è scelto il codone più frequentemente usato in pomodoro;
- le mutazioni introdotte sono state tutte controllate in modo tale da escludere la possibile formazione di sequenze aventi particolare funzione, come per esempio segnali di poliadenilazione o segnali di splicing, anche criptici.

In particolare la sequenza polinucleotidica è stata sintetizzata a partire da oligonucleotidi mediante l'assemblaggio tramite PCR (Prodromou and Laurence, 1992; Stemmer *et al.*, 1995) usando una DNA polimerasi termostabile con attività di correzione "proof reading" (PfuDNA Polymerase, Stratagene).

ING. DANIELE & ZACCARO ROMA SPA



I risultati conseguiti e descritti negli esempi evidenziano che è possibile ottenere resistenze durevoli ai geminivirus esprimendo in pianta un transgene consistente in una sequenza polinucleotidica derivata dal patogeno, se quest'ultima viene opportunamente scelta o modificata ad arte per non essere bersaglio, o essere un bersaglio inefficiente, del silenziamento genico post-trascrizionale del virus infettante.

## BIBLIOGRAFIA

- Hanley-Bowdoin, L., S.B. Settagle, B.M. Orozco, S. Nagar and D. Robertson. 1999. *Geminivirus*: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18:71-106.
- Briddon, R.W. and P.G. Markham. 1995. *Geminiviridae*, Sixth report of international committee on taxonomy of viruses. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Fauquet CM, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC, Stanley J. 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list of *begomovirus* species. *Arch Virol*. 148:405-21.
- Czosnek, H., and H. Laterrot. 1997. A world survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Archives of Virology* 142:1391-1406.
- Picò, B., M.J. Díez and F. Nuez. 1996. Viral disease causing economic losses to the tomato crop. II. The tomato yellow leaf curl virus review. *Scientia Horticulturae* 67:151-196.
- Polston, J. E. and P. K. Anderson. 1997. The emergence of whitefly-transmitted gemini viruses in tomato in the Western hemisphere. *Plant Disease* 81:1358-1369.
- Kheyr-Pour A., M. Bendahmane, V. Matzeit, G.P. Accotto, S. Crespi and B. Gronenborn. 1991. Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite *Geminivirus*. *Nucleic Acids Research* 19:6763-6769.

- Cahill, M., K. Gorman, S. Kay and I. Denliolm. 1996. Baseline determination and detection of resistance to imidacloprid in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Bulletin of Entomology. Research 86:343-349.
- Williams, L., T. J. Dennehy and J. C. Palumbo 1996. Development of a resistance management program for imidacloprid"Proc. Beltwide Cotton Conferences pp. 752-755.
- Abel PP, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science 232:738-43.
- Tavazza, M., A. Lucoli. 1993. Approcci Molecolari per la Resistenza alle Virosi. In "Miglioramento Genetico per Resistenza a Patogeni e Parassiti." Fondamenti Teorici e Pratici. Buiatti M., Crinò P., Porta-Puglia F., Saccardo F., Sonnino A., Surico G.. (Editori). Ed. Agricole Bologna. 191-214.
- Beachy, R. 1997. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. Current Opinion in Biotechnology 8:215-220.
- Baulcombe DC 1996. Mechanisms of Pathogen-Derived Resistance to Viruses in Transgenic Plants. 8:1833-1844.
- Zaitlin M. and Palukaitis P. 2000. Advances in understanding plant viruses and virus diseases. Annual review of phytopathology 38: 117-143.

- Szittyá, G., D. Silhavy, A. Molnar, Z. Havelda, A. Lovas, L. Lakatos, Z. Banfalvi and J. Burgyan. 2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. EMBO Journal 22:1-8.
- Brunetti, A., R. Tavazza, E. Noris, A. Lucioli, G. P. Accotto, and M. Tavazza, 2001, J Virol. 75:10573-81.
- Noris, E., G. P. Accotto, R. Tavazza, A. Brunetti, S. Crespi, and M. Tavazza. 1996. Resistance to tomato yellow leaf curl *Geminivirus* in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with a truncated viral C1 gene [published erratum appears in Virology 1997 Jan 20;227(2):519]. Virology 224:130-8.
- Sangaré, A., D. Deng, C.M. Fauquet and R. Beachy. 1999. Resistance to African cassava mosaic virus conferred by a mutant of the putative NTP-binding domain of the Rep gene (AC1) in *Nicotiana benthamiana*. Molecular Biology Reports 5:95-102.
- Kunik, T., R. Salomon, D. Zamir, N. Navot, M. Zeidan, I. Michelson, Y. Gafni and H. Czosnek 1994. Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. Bio/technology 12:500-504.
- Voinnet, O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. Trends in Genetics 17:449-459.
- Waterhouse, P.M., M.B. Wang and T. Lough. 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. Nature 411:834-842.

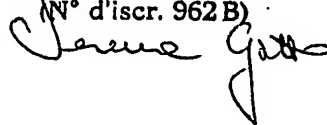
ING. DANZARÉ & ZAPATO ROMA SpA





- English J., Mueller E., and Baulcombe D.C. 1996. Suppression of Virus Accumulation in Transgenic Plants Exhibiting Silencing of Nuclear Genes. *Plant Cell*. 8: 179-188.
- Cox, K. H., D. V. DeLeon, L. M. Angerer, and R. C. Angerer. 1984. Detection of mrnas in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev Biol* 101:485-502
- Dalmay, T., A. Hamilton, E. Mueller, and D. C. Baulcombe. 2000. Potato virus X amplicons in arabidopsis mediate genetic and epigenetic gene silencing. *Plant Cell* 12:369-379.
- Krake, L.R., M.A Rezaian, and I.B. Dry. 1998. Expression of the tomato leaf curl *Geminivirus* C4 gene produces viruslike symptoms in transgenic plants *Molecul Plant Microbe Interactions* 11:413-417.
- Prodromou, C. and L.H. Pearl. 1992. Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis: *Protein Engineering*, 5:827-829.
- Stemmer, W.P.C., A. Cramer, K.D. Ha, T.M. Brennan, H.L. Heyneker. 1995. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene*, 164:49-53.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Serena Gitto  
(N° d'iscr. 962 B)



ING. BAZZANO & ZAMBRANO ROMA SPA



RIVENDICAZIONI

RM 2003 A 000242

1. Sequenza polinucleotidica codificante per una sequenza amminoacidica derivata dai geminivirus, detta sequenza polinucleotidica essendo mutata in modo tale da non essere bersaglio o da essere bersaglio inefficiente del silenziamento post-trascrizionale virale e avente:

- a) un'omologia a livello nucleotidico inferiore o uguale al 90% rispetto alla corrispondente sequenza genica dei geminivirus verso i quali si vuole ottenere la resistenza;
- b) un'omologia continua nell'RNA trascritto, rispetto alla corrispondente sequenza genica dei geminivirus, inferiore o uguale a 17 nucleotidi;
- c) una lunghezza massima della sequenza contenente una singola sostituzione rispetto alla corrispondente sequenza genica dei geminivirus non superiore a 30 nucleotidi;

detta sequenza polinucleotidica essendo in grado di conferire alle piante, loro tessuti o cellule vegetali con essa trasformate una resistenza durevole contro i geminivirus.

2. Sequenza secondo la rivendicazione 1, in cui l'omologia a livello nucleotidico rispetto alla corrispondente sequenza genica del geminivirus è inferiore o uguale all'80%.

3. Sequenza secondo la rivendicazione 1, in cui l'omologia a livello nucleotidico rispetto alla corrispondente sequenza genica del geminivirus è inferiore o uguale al 70%.

ING. DANIELO & ZACCARO ROMA SPA

4. Sequenza secondo ognuna della rivendicazioni precedenti, in cui l'omologia continua nell'RNA trascritto rispetto alla sequenza genica dei geminivirus è inferiore o uguale a 8 nucleotidi.

5. Sequenza secondo ognuna della rivendicazioni precedenti, in cui la lunghezza massima della sequenza contenente una singola sostituzione rispetto alla corrispondente sequenza genica dei geminivirus non è superiore a 20 nucleotidi.

6. Sequenza secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti, in cui i geminivirus sono scelti dal gruppo che consiste nelle specie e loro isolati di *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* e *Topocuvirus*.

7. Sequenza secondo la rivendicazione 6, in cui le specie dei *Begomovirus* sono scelte dal gruppo che consiste in TYLCCNV, TYLCGV, TYLCMaIV, TYLCSV, TYLCTHV, TYLCV, ACMV, BGMV, CaLCuV, ToCMoV, TGMV, ToGMoV, ToMHV, ToMoTV, ToMoV, ToRMV, ToSLCV, ToSRV, Cotton leaf curl (CLCrV, CLCuAV, CLCuGV, CLCuKV, CLCuMV, CLCuRV), East African cassava mosaic (EACMCV, EACMMV, EACMV, EACMZV), Potato yellow mosaic (PYMPV, PYMTV, PYMV), Squash leaf curl (SLCCNV, SLCV, SLCYV), Sweet potato leaf curl (SPLCGV, SPLCV), Tobacco leaf curl (TbLCJV, TbLCKoV, TbLCYNV, TbLCZV), Tomato leaf curl (ToLCBV, ToLCBDV, ToLCGV, ToLCKV, ToLCLV, ToLCMV, ToLCNDV, ToLCSLV, ToLCTWV, ToLCVV, ToLCV) e loro isolati.

8. Sequenza secondo la rivendicazione 6, in cui le specie appartenenti ai generi *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* sono scelte

dal gruppo che consiste in WDV, MSV, SSV, BYDV, TYDV, BCTV e loro isolati.

9. Sequenza secondo la rivendicazione 1, in cui la sequenza genica è scelta dal gruppo che consiste in C1/AL1/AC1, C2/AL2/AC2, C3/AL3/AC3, C4/AL4/AC4, V1/AR1/AC1, V2/AR2/AV2, BC1/BL1 e BV1/BR1, appartenenti ai geminivirus.

10. Sequenza secondo la rivendicazione 9, in cui la sequenza genica C1/AL1/AC1 è appartenente ai geminivirus come definiti nelle rivendicazioni 7 e 8.

11. Sequenza secondo la rivendicazione 1, in cui la sequenza amminoacidica dei geminivirus è una proteina derivata dal patogeno in grado di conferire resistenza contro i geminivirus alle piante che la esprimono.

12. Sequenza secondo la rivendicazione 11, in cui la proteina è scelta dal gruppo che consiste in proteina del capsido, proteina virale associata alla replicazione (Rep), proteine codificate dai geni C2/AL2/AC2, C3/AL3/AC3, C4/AL4/AC4, V2/AR2/AV2, BC1/BL1 e BV1/BR1.

13. Sequenza secondo la rivendicazione 1, in cui le piante, loro tessuti o cellule appartengono al gruppo che consiste in pomodoro, peperone, tabacco, zucchini manioca, patata dolce, cotone, melone, patata, soia, vigna, mais, frumento, canna da zucchero, fagiolo, zucchini, barbabietola.

14. Costrutto comprendente una sequenza polinucleotidica eterologa contenente in direzione 5'-3':

ING. BARIANO & ZANARDI ROMA SPA



a) una sequenza polinucleotidica funzionante come promotore in detta pianta o tessuto o cellule trasformate;

b) una sequenza polinucleotidica non tradotta posizionata al 5' della regione codificante;

c) una sequenza polinucleotidica come definita nelle rivendicazioni da 1 a 13, o un suo frammento o una sua variante;

d) una sequenza funzionante come terminatore della trascrizione, posizionata in 3' rispetto a detta sequenza polinucleotidica.

15. Vettore di espressione comprendente il costrutto come definito nella rivendicazione 14.

16. Pianta, tessuto o cellule vegetali transgeniche comprendenti nel loro genoma una sequenza polinucleotidica come definita nelle rivendicazioni da 1 a 13.

17. Progenie delle piante e dei tessuti vegetali secondo la rivendicazione 16.

18. Seme comprendente nel suo genoma una sequenza polinucleotidica come definita nelle rivendicazioni da 1 a 13.

19. Metodo per la preparazione di piante transgeniche, loro tessuti o cellule vegetali resistenti in maniera duratura ai geminivirus che comprende le seguenti fasi:

a) identificazione o scelta di una sequenza genica virale codificante per una sequenza amminoacidica in grado di conferire resistenza ai geminivirus;

DEPOSITO IN DATA 10/01/2000

b) mutagenesi della sequenza genica virale in modo tale da renderla un bersaglio inefficiente del silenziamento post-trascrizionale indotto dal geminivirus infettante;

c) inserimento della sequenza genica di geminivirus mutata ottenuta nella fase b) nella pianta, suo tessuto o cellula vegetale mediante un costrutto come definito nella rivendicazione 14.

20. Metodo secondo la rivendicazione 19, in cui la mutagenesi mantiene un'omologia a livello nucleotidico rispetto alla sequenza genica del geminivirus verso il quale si vuole ottenere resistenza inferiore o uguale al 90% distribuita in modo tale che l'omologia continua nell'RNA trascritto rispetto alla corrispondente sequenza genica dei geminivirus sia inferiore o uguale a 17 nucleotidi e la lunghezza massima della sequenza contenente una singola sostituzione rispetto alla corrispondente sequenza genica dei geminivirus non sia superiore a 30 nucleotidi.

21. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni 19 e 20, in cui la mutagenesi mantiene un'omologia a livello nucleotidico rispetto alla sequenza genica del geminivirus inferiore o uguale all'80%.

22. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni 19 e 20, in cui la mutagenesi mantiene un'omologia a livello nucleotidico rispetto alla sequenza genica del geminivirus inferiore o uguale al 70%.

23. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni da 19 a 22, in cui la mutagenesi mantiene un'omologia continua a livello nucleotidico rispetto alla sequenza genica del geminivirus inferiore o uguale a 8 nucleotidi.

ING. PATRIZIO & ZUCCHETTI S.p.A.

24. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni da 19 a 23, in cui la lunghezza massima della sequenza contenente una singola sostituzione rispetto alla corrispondente sequenza genica dei geminivirus non sia superiore a 20 nucleotidi.

25. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni da 19 a 24, in cui la mutagenesi consiste in mutazioni puntiformi silenti o in delezioni e/o inserzioni e/o sostituzioni.

26. Metodo secondo le rivendicazioni 19 e 25, in cui la mutagenesi nella fase b) consiste in delezioni della regione 3' della sequenza genica virale fino all'identificazione della minima regione 5' di detta sequenza genica che sia sottorappresentata, rispetto alla sequenza codificante la proteina wild-type, nella popolazione dei siRNA interferenti e che detta proteina tronca mantenga la capacità di conferire resistenza ai geminivirus.

27. Metodo secondo la rivendicazione 26, in cui la sequenza genica virale della fase a) è il gene C1/AL1/AC1.

28. Metodo secondo la rivendicazione 26, in cui il gene C1/AL1/AC1 è del TYLCSV.

29. Metodo secondo la rivendicazione 26, in cui la sequenza amminoacidica è una proteina tronca rispetto alla proteina virale wild-type.

30. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni da 26 a 29, in cui la proteina tronca è la Rep130.

Roma, 19 MAR. 2003

ING. BARTARO & ZUCCHATO ROMA SPA

p.p.: ENEA - Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente;

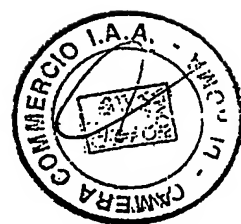
CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

Ing. Barzanò & Zanardo Roma S. p. A.

SG/IC

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Serena Gitto  
(N° d'iscr. 962 B)  
*Serena Gitto*

*Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.*

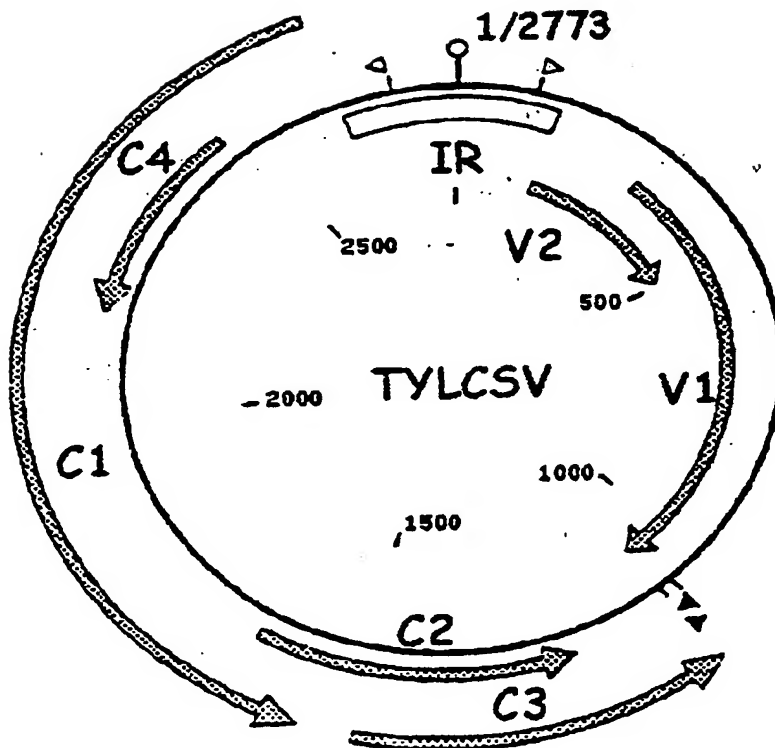




C-03/03

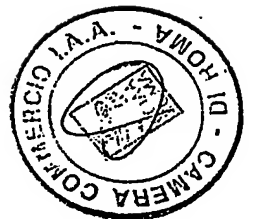
Fig. 1

RM 2003 A 000242



p.p.: ENEA - Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente  
CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE  
Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Serena Gitto  
(N° d'iscr. 962 B)  
*Serena Gitto*



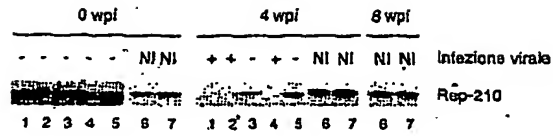
*2/m*

**C-03/03**

Fig. 2

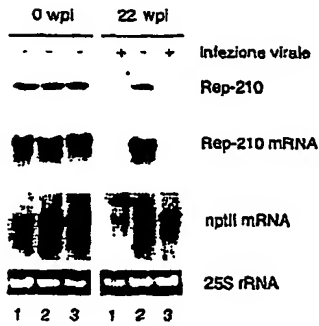
RM 2003 A 000242

A

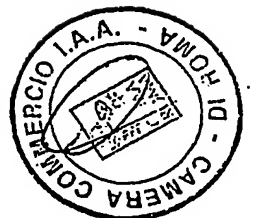


B

*FIG 3*



*Serena Gitto*

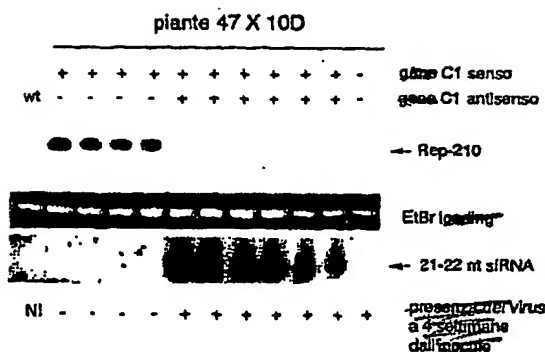


3/10

~~C-03/03~~

RM 2003 A 000242

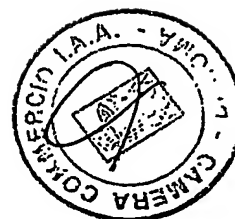
Fig. 3



p.p.: ENEA – Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente  
CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE  
Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Serena Gitto  
(N° d'iscr. 962 B)

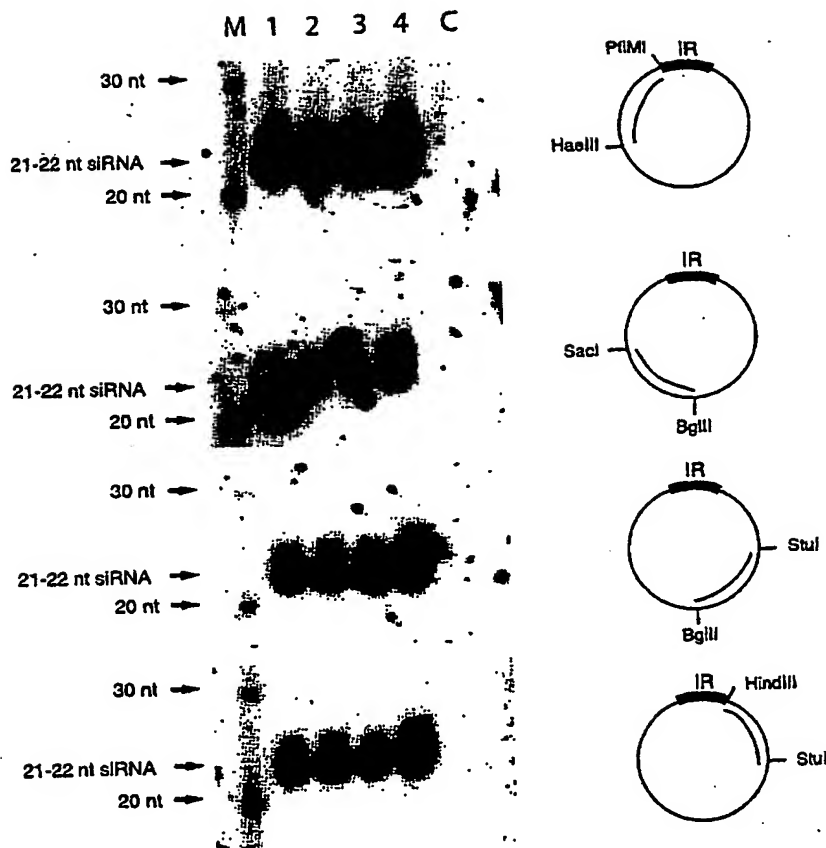
*Serena Gitto*



C-03/03

Fig. 5

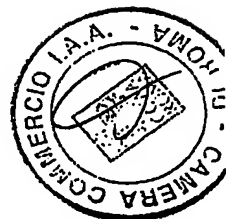
RM 2003 A 000242



p.p.: ENEA – Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente  
CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE  
Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Serena Gitto  
(N° d'iscr. 962 B)

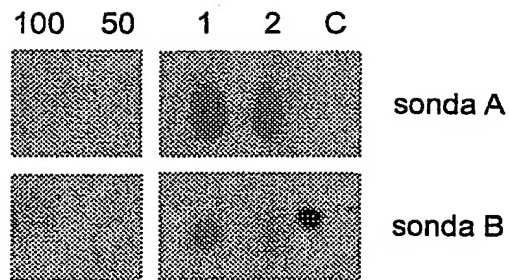
*Serena Gitto*



5/10

RM 2003 A 000242

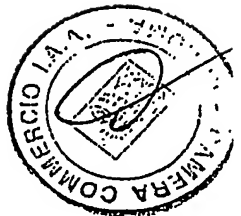
Fig. 6



p.p.: ENEA – Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente  
CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE  
Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Serena Gitto  
(N° d'iscr. 962 B)

*Serena Gitto*



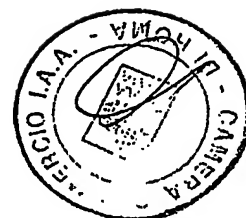
6/10  
C-03/03

Fig. 7

RM 2003 A 000242

GGATCCCCctggatactttgagtggtcccccgattcagaac 40  
gacagcaaaaaatgccaagatcaggtcgtttttagtatcaag 80  
gctaaaaaattatttccttacatatcccaaattgtgatttaa 120  
caaaagaaaaatgcactttcccaaataacaaacctacaaac 160  
acccacaaacaaattattcatcaaaatttgcagagaaacta 200  
catgaaaatggggaacctcatctccatatttgcacccaat 240  
tcgaaggaaaatacaattgtaccaatcaacgattcttcga 280  
cctggtatccccaaccagggtcagcacatttccatccgaac 320  
attcagggagctaaatcgagctccgacgtcaagtcctata 360  
tcgacaaggacggagatgttcttgaatggggtactttcca 400  
gatcgacggacgatctgctaggggaggacaacagacagcc 440  
tGAATTC 447

*Serena Gitto*

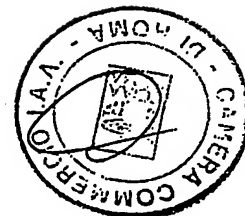
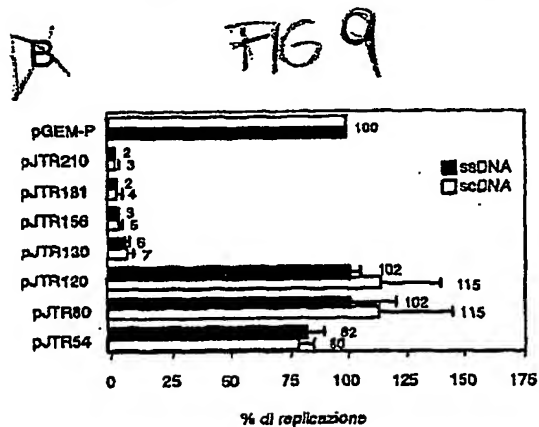
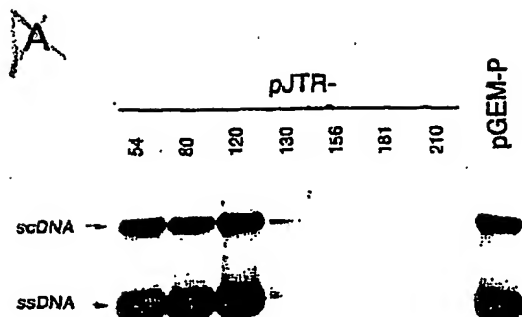


~~C-03/03~~

7/10

RM 2003 A 000242

Fig. 8



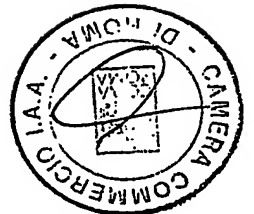
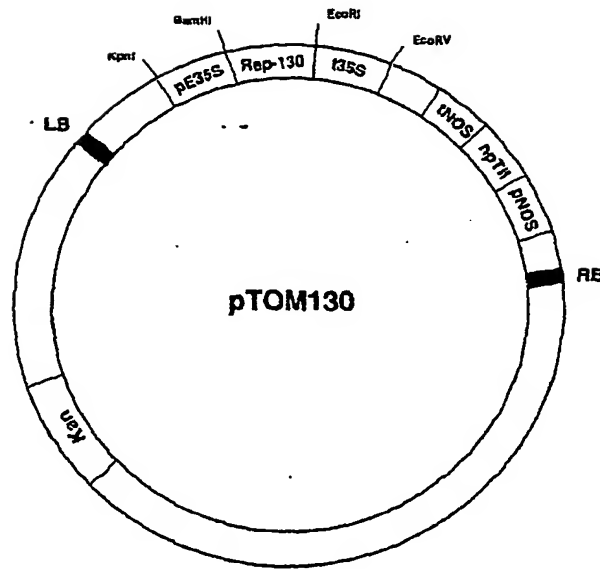
Serena Gitto

8/10

~~C-03/03~~

Fig. 10

RM 2003 A 000242



p.p.: ENEA – Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente  
CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE  
Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Serena Gitto  
(N° d'iscr. 962 B)

*Serena Gitto*



C-03/03

9/10

RM 2003 A 000242

~~Fig. 9~~

FIG 11

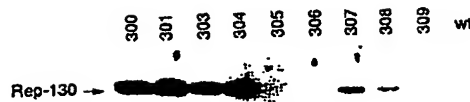
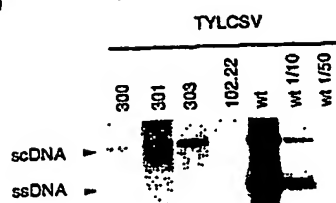
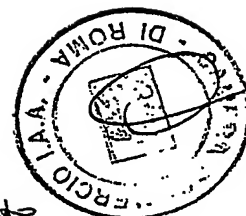


FIG 12



*Serena Gitto*



*Sirane Gish*

p.p.: ENEA – Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente  
CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE  
Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

## A. RICHIEDENTE(I)

1) Denominazione ENEA - Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente N.G. E N  
 Residenza Roma, RM codice 0 1 3 2 0 7 4 0 5 8 0  
 2) Denominazione CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE N.G. E N  
 Residenza Roma, RM codice 0 0 9 6 2 4 2 1 0 0 4

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

Cognome e nome GITTO Serena ed altri Cod. fiscale   
 Denominazione studio di appartenenza Inq. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.  
 Via Piemonte n. 26 città ROMA Cap 0 0 1 8 7 (prov) R M

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario Inq. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

Via Piemonte n. 26 città ROMA Cap 0 0 1 8 7 (prov) R M

## D. TITOLO

classe proposta (sez./cl./sci) gruppo/sottogruppo 

"Metodo per la preparazione di piante transgeniche resistenti in maniera duratura ai geminivirus".

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒ SE ISTANZA: DATA  /  /  N° PROTOCOLLO 

## E. INVENTORI DESIGNATI

cognome e nome

cognome e nome

1) TAVAZZA Mario3) LUCIOLI Alessandra2) NORIS Emanuela4) ACCOTTO Gian Paolo

## PRIORITY

nazione o  
organizzazionetipo di  
priorità

numero di domanda

data di deposito

Allegato  
S/R1) 2) 

## SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N. Protocollo

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

001 - I titolari partecipano ai diritti sul brevetto nelle seguenti misure:

ENEA - Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente: 50%CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE: 50%

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.   
 Doc. 1) 1 n. pag. 5 2 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)  
 Doc. 2) 1 PROV n. tav. 1 0 Disegno  
 Doc. 3) 2 Lettera d'incarico  
 Doc. 4) 1 designazione inventore  
 Doc. 5)  documenti di priorità con traduzione in italiano  
 Doc. 6)  autorizzazione o atto di cessione  
 Doc. 7)  nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale Euro QUATTROCENTOSETTANTADUE /56

obbligatorio

COMPILATO IL 19 / 05 / 2003FIRMA DEL(I)  
RICHIEDENTE(I)Enea - Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e ...  
CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHECONTINUA SÌ/NO SÌInq. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A. Serena GittoDEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SÌ/NO SÌ

(N° G. 962 B)

CAMERA di COMMERCIO, IND. ART. e AGR. - ROMAVERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA BM 2003 A 000242L'anno DUEMILATREil giorno DICIANNOVE

del mese di

MAGGIOIl(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 0 1 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE

L'Ufficiale Rogante  
Silvia Altieri

FOGLIO AGGIUNTIVO n. 01

di totali 01

DOMANDA N.

RM 2003 A 000242

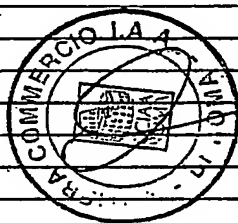
N.G.

## A. RICHIEDENTE (1)

<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		codice
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		codice
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		codice
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		codice
<input type="checkbox"/>	Denominazione		
<input type="checkbox"/>	Residenza		codice

## E. INVENTORI DESIGNATI

	cognome e nome		cognome e nome
05	TAVAZZA Raffaella		
06	BRUNETTI Angela		



## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R	SCIOGLIMENTO RISERVE Data N° Protocollo

FIRMA DEL (1) RICHIEDENTE(1)

1) ENEA - Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente

2) CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

Ing. Barzanò &amp; Zanardo Roma S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri

Serena Gitto

(N° d'iscr. 962B)

Serena Gitto

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

RMR0495

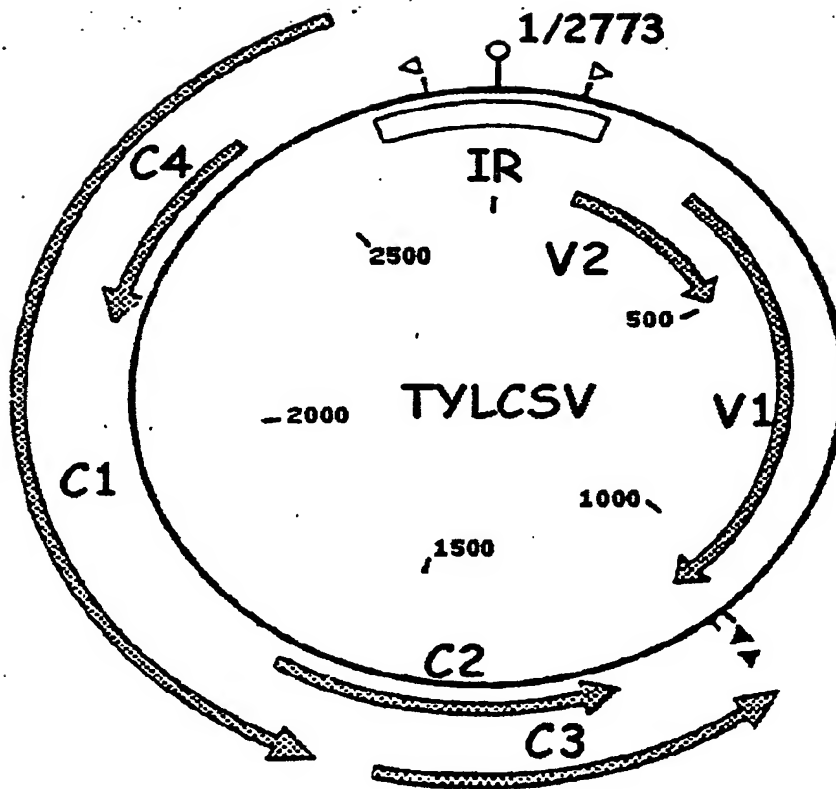


Fig. 1



UN MANDATO...  
per se e per gli altri  
Antonio Taliencio  
(15° d'apr. 1971)

*Antonio Taliencio*

2/10

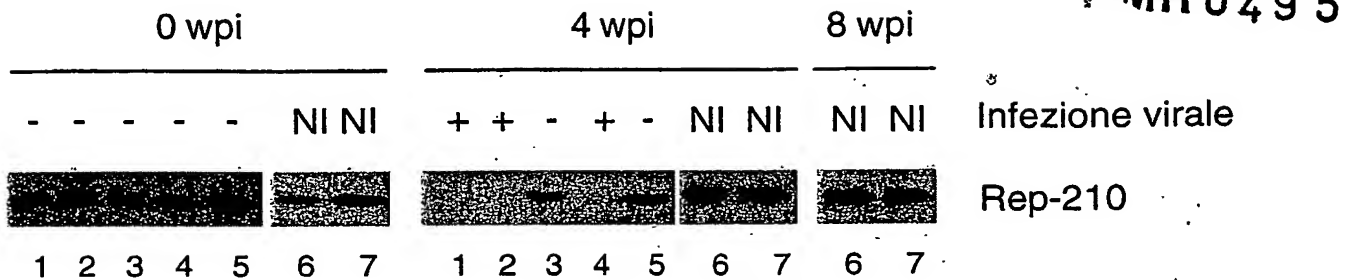


Fig. 2

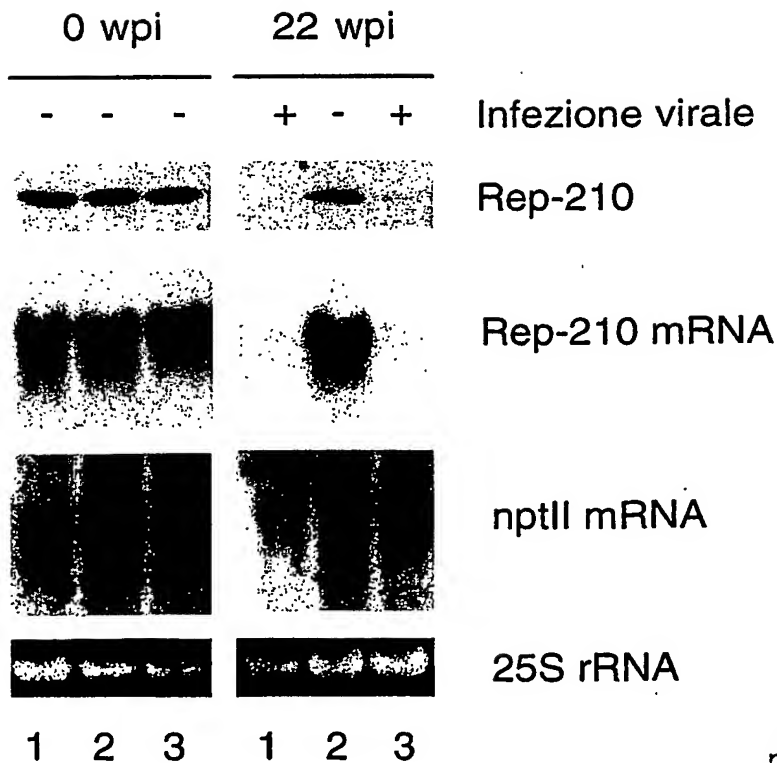


Fig. 3



UN MANDATO  
per se e per gli altri  
Antonio Telleria  
N° d'is. n° 11

*Handwritten signature*

3/10

PMR 0495

piante 47 X 10D

	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	C1 senso
wt	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	C1 antisenso



← Rep-210



EtBr



← 21-22 nt siRNA

NI	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

presenza del virus  
a 4 settimane  
dall'inoculo

Fig. 4



4/10

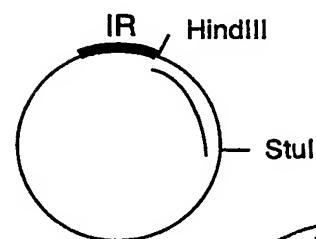
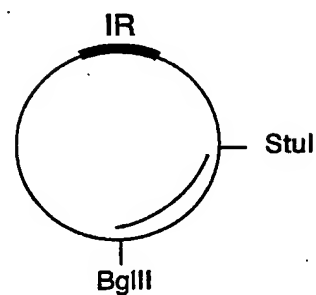
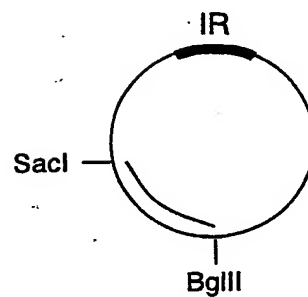
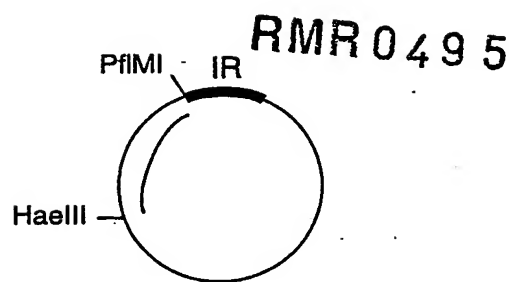
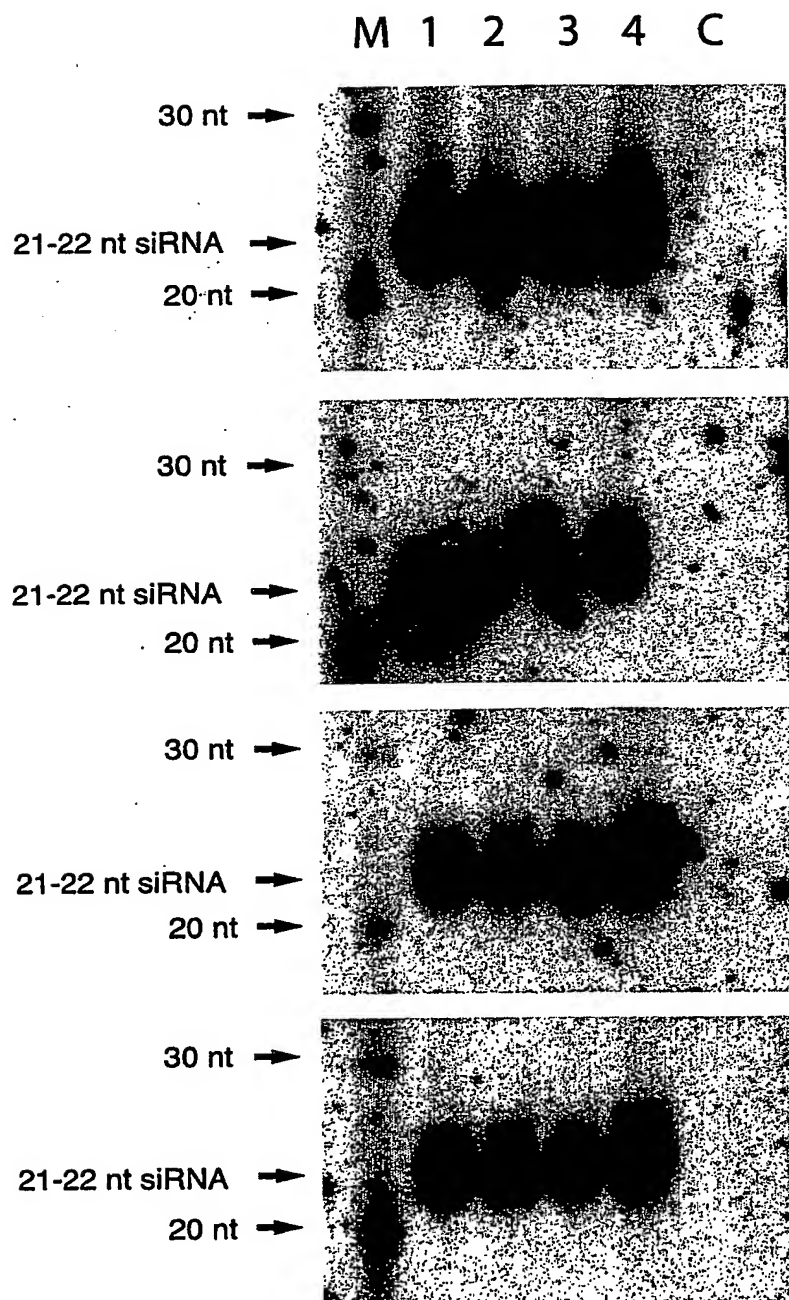
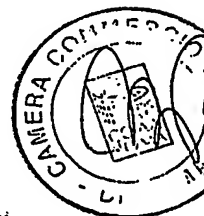


Fig. 5



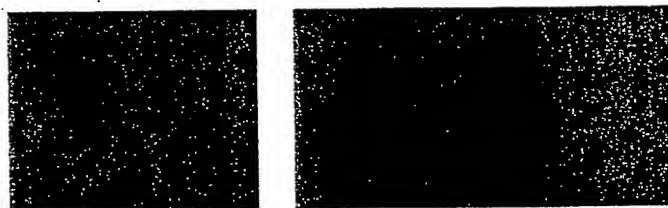


5/10

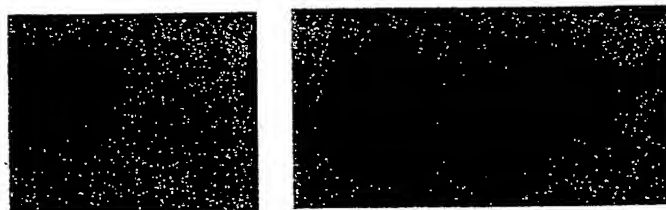
RME0495



100 50 1 2 C



sonda A



sonda B

Fig.6



UN'idea...  
per se e per gli altri:  
Antonio Talierno  
IN° 6/1971 1711

*Antonio Talierno*

518 293

GGATCCCCctggatacttttgagtgtcccccgattcagaac 40  
gacagcaaaaa**atg**ccaagatcaggtcgttttagtatcaag 80  
gctaaaaattatttccttacatatcccaaattgtgatttaa 120  
caaaagaaaatgcactttcccaaataacaaacctacaaac 160  
acccacaaacaaattattcatcaaaatttgcagagaacta 200  
catgaaaatggggaacctcatctccatattt**tgat**ccaat 240  
tcgaaggaaaatacaattgtaccaatcaacgattcttcga 280  
cctggtatccccaaccaggtcagcacatttccatccgaac 320  
attcagggagctaaatcgagctccgacgtcaagtcctata 360  
tcgacaaggacggagatgttcttgaatggggtactttcca 400  
gatcgacggacgatctgctaggggaggacaacagacagcc 440  
**tGAATTC** 447

Fig. 7



*Antonio Talierno*

7/10

RMR 0495



Fig. 8

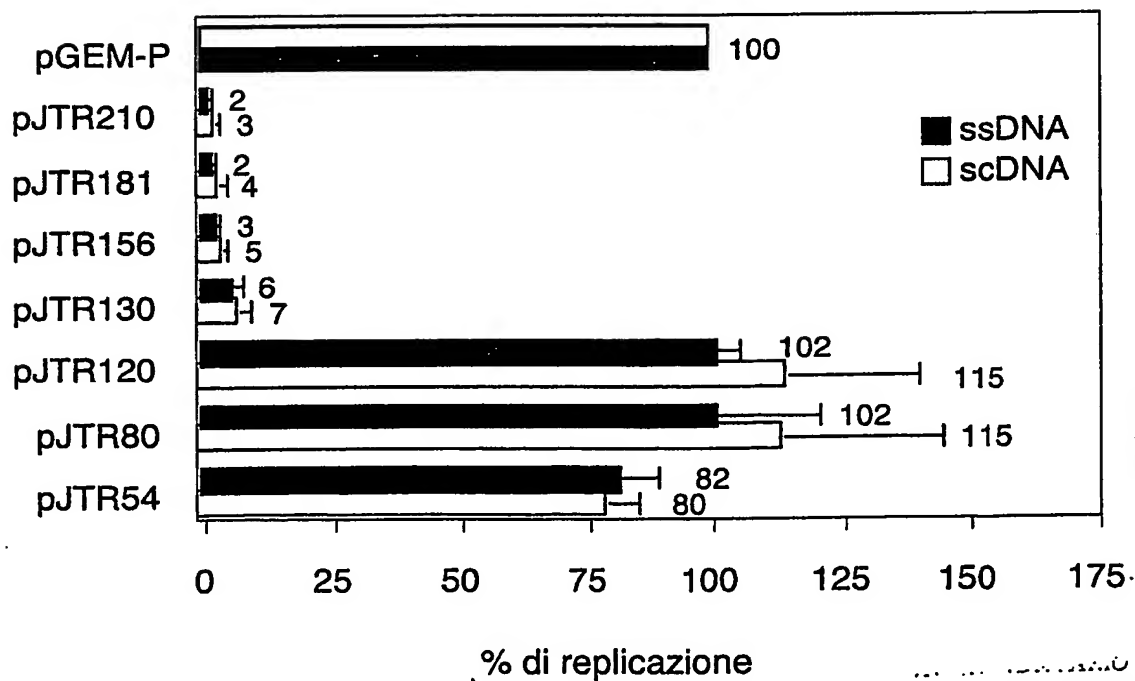
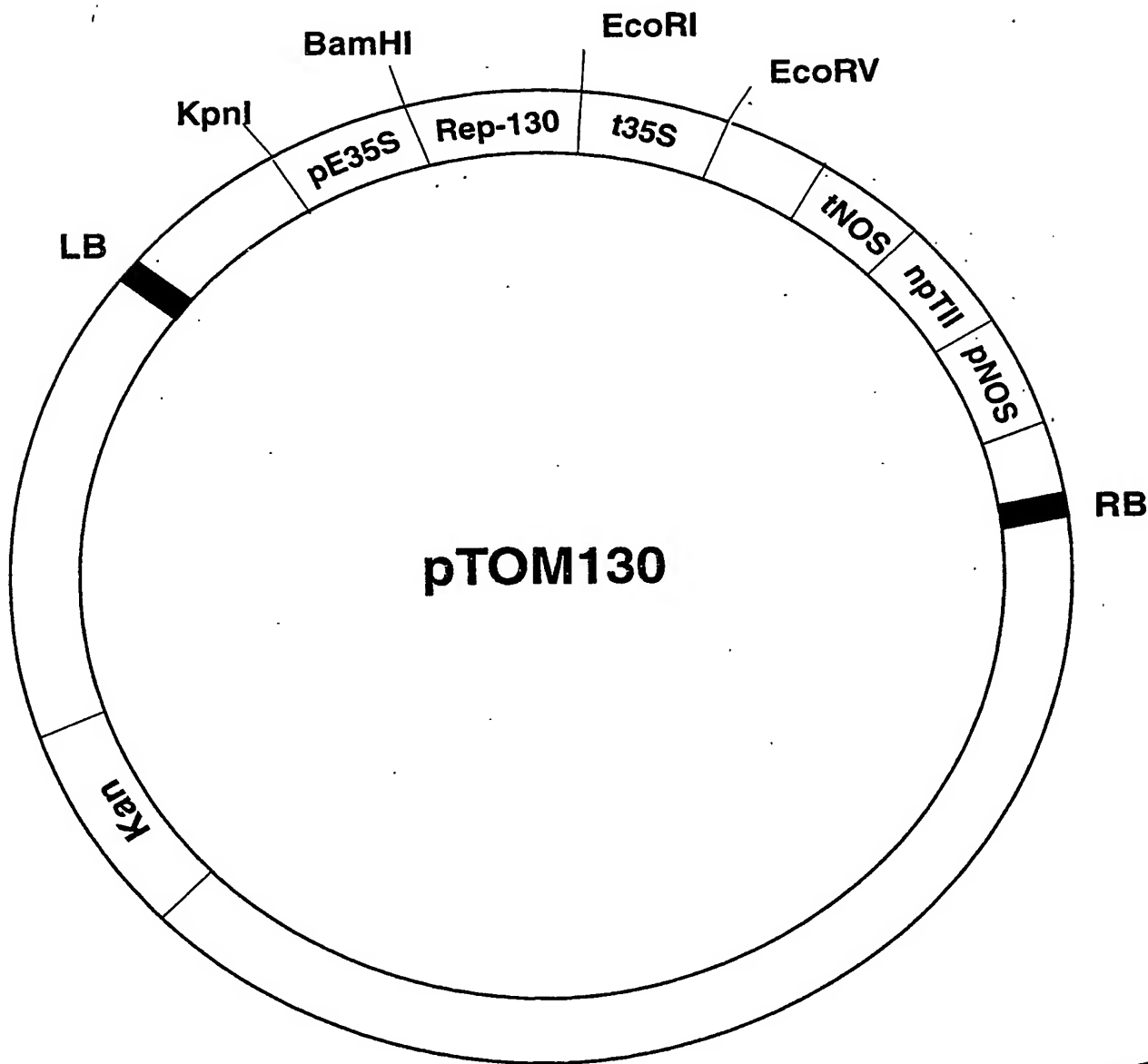


Fig. 9

per se e per gli altri  
 Antonio Taliervo  
 1711

*Taliervo*





**Fig. 10**

p.p.: ENEA – Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente  
 CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE  
 Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.



Un'idea, un'azione  
 per se e per gli altri  
 Antonio Taliario

*Taliario*

9/10

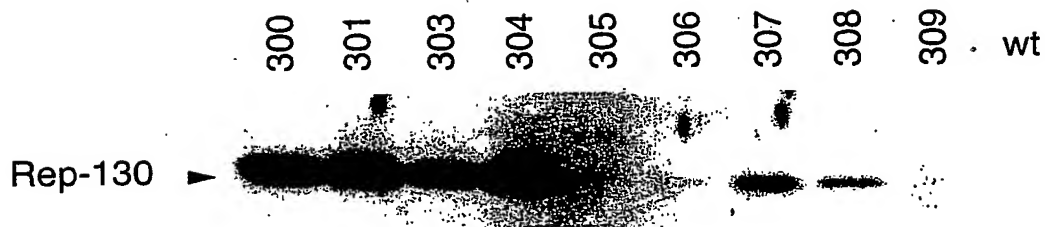


Fig. 11

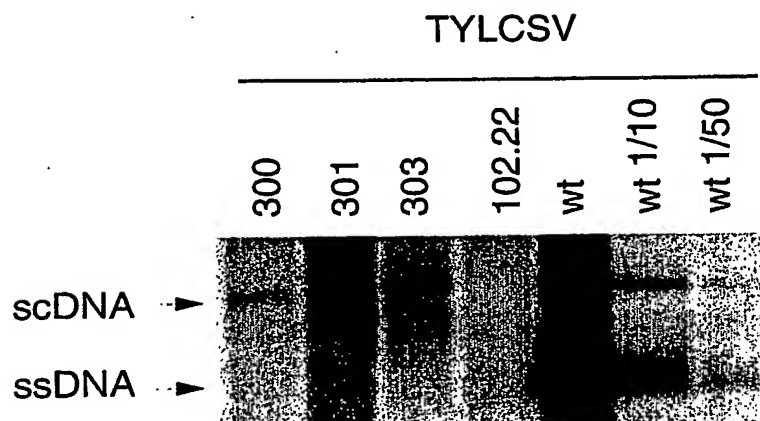


Fig. 12




10/10

RMR 0495

Antonio Tallero  
1111 1/2 Ave. W  
St. Paul, Minn.

**Fig. 13**



Seq. cod. Rep210\_wild\_type  
Seq. cod. Rep210\_silencing\_minus

10/10

RMP

1	1	A	T	G	C	C	A	A	G	A	T	C	A	G	G	T	T	T	A	G	T	A	T	C	A	A	A	A	A	T	T	T	C	C	T	T	A	C	A	T	A	T	C		
		A	T	G	C	C	A	T	C	C	G	G	A	A	G	A	G	A	T	T	A	G	A	T	C	A	A	A	A	A	T	T	T	C	C	T	T	A	C	A	T	A	T	C	
		60	70	80	90	100	110																																						
56	56	C	C	A	A	A	T	G	T	A	T	C	A	A	G	G	C	T	T	T	C	C	A	A	A	T	A	A	C	A	A	C	C	T	A	C	A	A	A	A	C				
58	58	C	C	A	A	G	T	G	T	A	A	C	T	A	A	G	A	A	T	T	G	C	C	A	G	A	T	A	A	C	T	A	A	C	T	T	T	G	C	A	A	C			
		120	130	140	150	160																																							
111	111	A	C	C	C	A	C	A	A	A	T	T	C	A	A	A	A	T	T	T	G	C	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
111	111	T	C	C	C	A	C	T	A	A	C	T	A	A	G	A	A	T	T	T	G	C	A	G	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
		170	180	190	200	210	220																																						
166	166	C	C	T	C	A	T	C	T	C	A	T	C	C	A	A	T	T	C	G	A	A	A	A	T	A	C	A	A	T	A	C	C	A	A	A	A	A	A	A	A				
168	168	C	C	A	C	A	T	A	T	G	T	T	G	A	T	A	A	T	A	T	A	A	T	A	A	A	T	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
		230	240	250	260	270																																							
221	221	G	A	T	T	C	T	T	C	G	A	C	C	T	G	T	A	T	C	C	C	C	A	A	C	C	A	A	C	C	A	A	C	C	A	A	A	A	A	A	A				
221	221	G	T	T	T	C	T	T	G	A	C	C	T	T	T	G	A	T	T	C	A	G	C	A	T	T	T	C	C	A	T	T	C	C	A	A	A	A	A	A	A				
		290	300	310	320	330																																							
276	276	G	G	G	A	G	C	T	A	A	A	T	C	G	A	C	G	T	C	T	A	T	A	T	C	G	A	C	A	A	G	G	A	C	G	G	A	G	A	T	G	T			
276	276	G	G	G	T	G	C	T	A	A	G	T	C	G	A	C	G	T	C	A	A	G	T	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A				
		340	350	360	370	380																																							
331	331	C	T	T	G	A	A	T	G	G	G	T	A	C	T	T	T	C	C	A	G	A	T	C	G	A	C	G	G	A	C	G	A	A	C	A	A	A	A	A	A				
331	331	C	T	G	A	G	T	G	G	G	A	A	C	T	T	T	T	C	A	G	A	T	C	G	A	C	G	G	A	C	G	A	A	C	A	A	A	A	A	A	A				
		390	400	410	420	430	440																																						
386	386	C	A	G	C	C	A	A	C	G	A	A	G	G	C	A	A	T	T	A	A	C	G	C	A	G	A	A	G	A	A	G	T	A	A	G	T	C	G	C	A	T			
386	386	C	A	G	C	T	A	A	C	G	A	T	G	C	C	A	T	T	T	A	A	C	G	C	A	A	G	A	A	G	T	A	A	G	T	C	A	C	A	G	C	A			
		450	460	470	480	490																																							
441	441	T	G	A	T	G	T	A	A	A	G	A	T	T	A	G	C	C	T	A	G	A	G	A	T	T	A	C	G	T	T	C	T	A	C	A	T	A	A	T	A				
441	441	T	G	A	C	G	T	A	A	T	C	A	A	G	A	G	T	T	A	G	C	T	A	G	A	T	T	T	C	T	A	C	A	T	T	T	C	A	T	A	A				
		500	510	520	530	540	550																																						
498	498	A	A	T	A	G	T	A	A	T	T	A	G	A	T	T	T	C	C	A	G	G	T	G	C	C	T	C	C	C	T	T	A	T	G	T	T	T	C	C	T				
498	498	A	A	C	A	G	C	A	A	T	T	G	G	A	C	A	A	T	T	T	A	G	T	G	C	C	T	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A				
		560	570	580	590	600																																							
551	551	T	T	T	A	T	C	T	T	C	T	T	T	C	G	A	T	C	A	A	G	T	T	C	C	T	G	A	T	G	A	A	C	T	T	G	A	A	C	A	C				
551	551	T	C	T	T	A	A	G	T	T	C	A	T	T	T	G	A	T	T	T	C	A	G	T	T	C	A	G	A	T	G	A	G	C	T	T	G	A	G	C	A				
		610	620	630																																									
606	606	G	A	A	C	G	T	C	A	T	G	G	A	T	G	C	C	G	C	T	G	C	G	C	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G					
608	608	A	A	A	C	G	T	A	T	G	G	A	C	G	C	C	G	C	C	A	A	G	C	A	A	G	C	A	A	G	C	A	A	G	C	A	A	G	C	A					

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**